

T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE NANCY

pour obtenir le grade de Docteur-Ingénieur

par

Jacques **DES** BORDES

— * * * —

PREMIERE THESE

Isollements et études biochimiques de ferroprotéines
chez Clostridium acetobutylicum.

DEUXIEME THESE

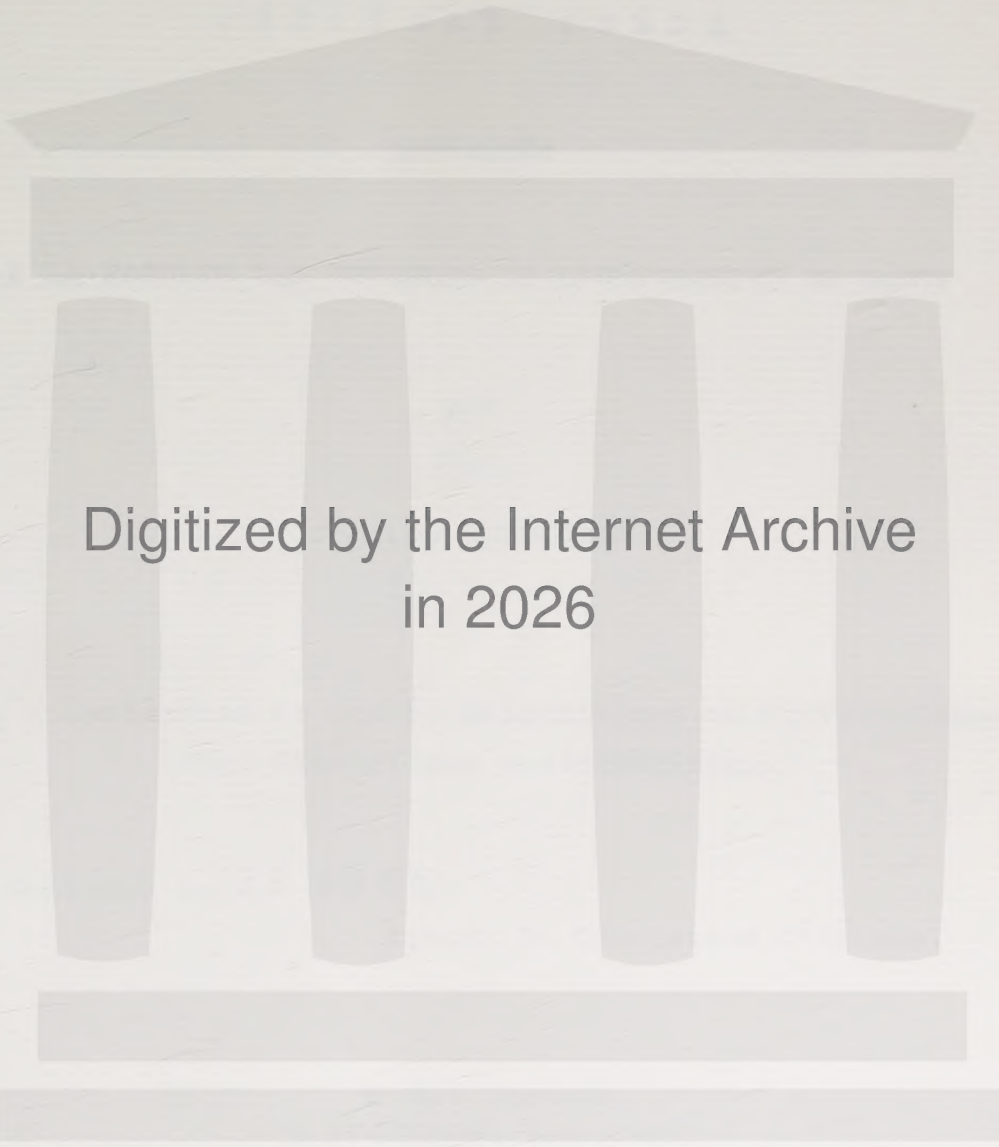
Proposition donnée par la Faculté

Soutenues le **30 JUIN 1970**

devant la Commission d'Examen.

M.

R. GAY, Président
A. ROSENBERG, Examineur
Ch. ALAIS, Examineur
M. METCHE, Examineur



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551908_0034

P R E M I E R E T H E S E

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE NANCY

par

Jacques DESBORDES

Sujet : Isolements et études biochimiques de ferroprotéines
chez *Clostridium acetobutylicum*.

Soutenue le 30 JUIN 1970

devant la Commission d'Examen.

III.

R. GAY, Président
A. ROSENBERG, Examineur
Ch. ALAIS, Examineur
M. METCHE, Examineur



Année Scolaire 1969/1970

DOYEN : M. AUBRY

ASSEESSEUR : M. GAY

Doyens Honoraires : MM. CORNUBERT - ROUBAULT.Professeurs Honoraires : MM. RAYBAUD - LAFFITTE - LERAY - JOLY -
LAPORTE - EICHORN - CAPELLE - GODMENT - DUBREIL - L. SCHWARTZ -
DIEUDONNE - LETORT - DODE - CAUTHIER - GOUDET - OLIER - CORNUBERT -
CHAPELLE - GUERIN - WAHL.Maîtres de conférences Honoraires : MM. LIENHART - PIERRET -
Mlle MATHIEU.PROFESSEURS

MM. ROUBAULT	Géologie	GAYET	Physiologie
VEILLET	Biologie animale	HADNI	Physique
BARRIOL	Chimie théorique	* BASTICK	Chimie
BIZETTE	Physique	DUCHAUFOR	Pédologie
GUILLIEN	Electronique	GARNIER	Agronomie
LEGRAS	Mécanique rationnelle	NEEL	Chimie Orga. Indust.
BOLFA	Minéralogie	BERNARD	Géologie appliquée
NICLAUSE	Chimie	* CHAMPIER	Physique
FAIVRE	Physique appliquée	* GAY	Chimie biologique
AUBRY	Chimie minérale	STEPHAN	Zoologie
COPPENS	Radiogéologie	* CONDE	Zoologie
DUVAL	Chimie	* WERNER	Botanique
FRUHLING	Physique	BYLAND	Calcul Différentiel et Intégral
HILLY	Géologie	FELDEN	Physique
LE GOFF	Génie chimique	* GOSSE	Mécanique Physique
SUHRER	Physique Expériment.*	* DAVOINE	Physique (ENSEIGN.)
CHAPON	Chimie biologique	HORN	Physique (1er Cycle)
HEROLD	Chimie Minér. Indust.	Mme LUMER	Mathématiques
SCHWARTZ B.	Exploitation minière*	DELPUSCH	Chimie physique
MALAPRADE	Chimie	Mlle HUET	Analyse Supérieures
* MANGENOT	Botanique	BLAZY	Minéralogie Appliq.

N... Chimie biologique

N... Mécanique appliquée

N... Méthodes Mathématiques de la Physique

N... Mécanique rationnelle

* Professeur titulaire à titre personnel.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Mme BASTICK	Chimie P.C. EPINAL	BALESDENT	Thermodynamique, chimie appliquée ENSIC
MM. GUEDEFIN	Physique	JANOT	Physique P.C. EPINAL
VUILLAUME	Psychophysiologie	CACHAN	Entomologie appl. ENSA
PRENTZ	Biologie animale	JACQUIN	Pédologie et chimie agr.
MARI	Chimie (ISIN)	MAINARD	Physique M.P.
DEVICT	Physique du solide	MARTIN	Chimie P.C.
FLECHON	Physique P.C.	PROTAS	Minéralogie
VIGNES	Métallurgie	DEPAIX	Probabilités et Statistiques
JURAIN	Géologie C. B. C.		
FAULMIER	Mécanique Expéri.		
RIVAIL	Chimie appl. CUCES		

MAITRES DE CONFERENCES

MM. VILLERMAUX	Génie Chimique	GERL	Physique ENSEM
METCHE	Biochimie appliquée (Brasserie)	ROQUES	Chimie minérale
BAUMANN	Physique 1er Cycle	FERRIER	Mathématiques
DURAND	Physique	GILORINI	Mécanique Flui. ISIN
GRANGE	Physique ISIN	HILY	Mathématiques P.C.
DAVEREZ	Chimie ENSIC	CASTRO	Chimie Organique
CHAMBON	Exploit. Minière	DEXHEIMER	Botanique
HUSSON	Physique ENSEM	NOVERRAZ	Mathématiques
WEISSLINGER	Physique	TOURET	Géologie
		N...	Maths appliquées
		N...	Mathématiques
		N...	Mathématiques
		N...	Mathématiques
		N...	Physiologie animale
		N...	Chimie (ENSIC)
		N...	Laiterie (Ecole Laiterie)
		N...	Chimie Organique
		N...	Maths appliquées

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM. AMARIGLIO - COEURE - DAVRAINVILLE - GIRARDEAU - OVALERT - RUYER - WEBER - PUJOL - SCHREIBER,

APPENDIX II

1. <i>Amphibia</i>	2. <i>Reptilia</i>	3. <i>Aves</i>	4. <i>Mammalia</i>
5. <i>Plantae</i>	6. <i>Fungi</i>	7. <i>Algae</i>	8. <i>Protozoa</i>
9. <i>Botany</i>	10. <i>Zoology</i>	11. <i>Physiology</i>	12. <i>Pathology</i>
13. <i>Pharmacology</i>	14. <i>Medicine</i>	15. <i>Surgery</i>	16. <i>Dentistry</i>
17. <i>Veterinary Medicine</i>	18. <i>Public Health</i>	19. <i>Hygiene</i>	20. <i>Nutrition</i>
21. <i>Forensic Medicine</i>	22. <i>Legal Medicine</i>	23. <i>Medical Jurisprudence</i>	24. <i>Medical Ethics</i>
25. <i>Medical History</i>	26. <i>Medical Geography</i>	27. <i>Medical Statistics</i>	28. <i>Medical Economics</i>
29. <i>Medical Law</i>	30. <i>Medical Literature</i>	31. <i>Medical Art</i>	32. <i>Medical Science</i>

APPENDIX III

1. <i>Amphibia</i>	2. <i>Reptilia</i>	3. <i>Aves</i>	4. <i>Mammalia</i>
5. <i>Plantae</i>	6. <i>Fungi</i>	7. <i>Algae</i>	8. <i>Protozoa</i>
9. <i>Botany</i>	10. <i>Zoology</i>	11. <i>Physiology</i>	12. <i>Pathology</i>
13. <i>Pharmacology</i>	14. <i>Medicine</i>	15. <i>Surgery</i>	16. <i>Dentistry</i>
17. <i>Veterinary Medicine</i>	18. <i>Public Health</i>	19. <i>Hygiene</i>	20. <i>Nutrition</i>
21. <i>Forensic Medicine</i>	22. <i>Legal Medicine</i>	23. <i>Medical Jurisprudence</i>	24. <i>Medical Ethics</i>
25. <i>Medical History</i>	26. <i>Medical Geography</i>	27. <i>Medical Statistics</i>	28. <i>Medical Economics</i>
29. <i>Medical Law</i>	30. <i>Medical Literature</i>	31. <i>Medical Art</i>	32. <i>Medical Science</i>

APPENDIX IV

...

A. H. A. F. A. I. N. L. D.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de NANCY.

J'adresse particulièrement mes remerciements,

à Monsieur le Professeur GUY pour la bienveillante attention qu'il a toujours portée à mon travail,

à tous mes camarades de Laboratoire pour les encouragements et les précieux conseils dont ils m'ont fait bénéficier,

à mes collègues du Laboratoire d'Analyses et des Services Techniques de l'Ecole de Brasserie pour l'aide efficace qu'ils m'ont souvent apportée.

LISTE DES ABBREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE OU
LES SCHEMAS

-	NAD ou NAD ⁺	= Nicotinamide Adénine dinucléotide
-	NADP ou NADP ⁺	= Nicotinamide Adénine dinucléotide phosphate
-	NADH ou NADH, H ⁺	= Nicotinamide Adénine dinucléotide réduit
-	NADPH ou NADPH, H ⁺	= Nicotinamide Adénine dinucléotide phosphate réduit
-	TPP	= Thiamine pyrophosphate
-	FAD	= Flavine adénine dinucléotide
-	FADH ₂	= Flavine adénine dinucléotide réduite
-	FMN	= Flavine mononucléotide
-	HSCoA ou CoA	= Coenzyme A
-	μm	= Millimicron = 10 ⁻⁶ m
-	μl	= Microlitre = 10 ⁻⁶ litre
-	μM	= Micromole = 10 ⁻⁶ mole
-	μμM	= Millimicromole = 10 ⁻⁹ mole
-	CMB	= Chloromercuribenzoate
-	ε _λ	= Coefficient d'extinction moléculaire pour la longueur d'onde
-	RPE	= Résonance paramagnétique électronique
-	DEAE	= Diethylaminoéthyl
-	U	= Unité enzymatique
-	TRIS	= Trihydroxyméthylaminométhane
-	D.O.	= Densité Optique
-	Δ D.O.	= Variation de densité optique

PARTIE THEORIQUE

ETAT DE NOS CONNAISSANCES SUR LES RUBREDOXINES

I - HISTORIQUE et DISTRIBUTION de la RUBREDOXINE -

En 1963, WILDER et Coll. (1) décrivent une ferrédoxine chez Clostridium thermosaccharolyticum et montrent que le spectre UV-visible de cette protéine dans l'état oxydé du composé, est en tous points comparable à celui de la rubredoxine isolée depuis chez plusieurs autres microorganismes. La même année, BUCHANAN et Coll. (2), puis MORTENSON en 1964 (3) signalent qu'au cours de la purification de la ferrédoxine de Clostridium pasteurianum, on peut observer une fraction protéique de couleur rouge. LOVENBERG et SOBEL (4) ont isolé cette fraction protéique sous forme cristalline ; ils lui ont donné le nom de "RUBREDOXINE" et la définition suivante : c'est une protéine à fer non-hémique de faible poids moléculaire qui peut se substituer à la ferrédoxine en tant que transporteur d'électrons dans plusieurs réactions catalysées par les extraits acellulaires de certains microorganismes. Toujours en 1965, SLODOWSKI (5) isole la rubredoxine de Clostridium sticklandii. Depuis, MAXEWM et PELL (6) ont isolé une rubredoxine chez Peptostreptococcus elsdenii et la rubredoxine de Desulfovibrio gigas a été extraite par LE GALL et DRAGONI la même année (7). HEMAN et POSTGATE ont séparé en 1968 la rubredoxine des extraits acellulaires de la variété fixatrice d'azote (azotovorans) de Desulfovibrio desulfuricans et ils indiquent qu'une rubredoxine a été extraite de Desulfovibrio vulgaris par CAMPBELL (8).

La rubredoxine a été trouvée par ailleurs chez Micrococcus lactilyticus (9) et Micrococcus aerogenes en 1967 par BACHELIER et Coll. (10).

Enfin, lors de travaux parallèles sur les bactéries du genre Pseudomonas, PETERSON et Coll. d'une part (11) et KUSUNOSE et Coll. d'autre part (12) ont montré que respectivement chez Pseudomonas oleovorans et chez Pseudomonas denitrificans la rubredoxine avait un rôle physiologique défini en fournissant les électrons nécessaires à l' ω -hydroxylation des hydrocarbures.

III - PURIFICATION et ISOLEMENT de la RUBREDOXINE -

Comme les ferrédoxines, les rubredoxines sont acidophiles ; de ce fait, elles peuvent être adsorbées sélectivement par chromatographie échangeuse d'ions sur diethyl-amino-ethyl cellulose (DEAE cellulose).

Le tableau N° 1 résume les étapes principales de la purification.

TRAITEMENT	MOYEN UTILISE
Extrait acellulaire	- Acétonolyse ou - Extrait sonique ou - Presse de French
Adsorption	- DEAE cellulose
Désorption	- TRIS. Cl Na
Dialyse	- Dextrans tamis moléculaires ou - Osmose
Séparation	- DEAE cellulose et gradient de force ionique en TRIS. HCl ou - DEAE cellulose et gradient négatif de $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ ou - Précipitation sélective au sulfate d'ammonium
Dialyse	"idem"
<u>Purification</u>	- éventuellement par précipitation 70-90 % $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$
<u>Cristallisation</u>	- contre $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ de 50 % à 90 % selon les cas

TABLÉAU N° 1 : Principales étapes de la préparation de la rubredoxine.

La dernière technique de séparation apparue est celle du gradient négatif de sulfate d'ammonium pratiquée par LOVEMBERG et WILLIAMS (13) (voir figure N° 1).

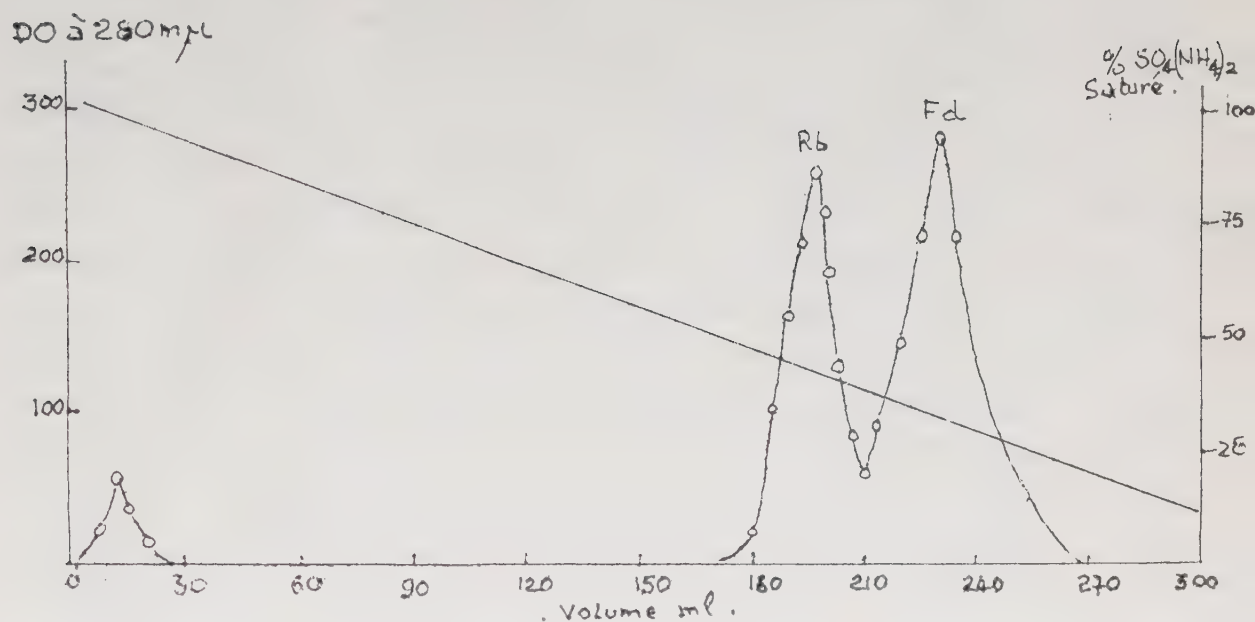


FIGURE 1 : Séparation sur colonne de DEAE-cellulose par gradient linéaire négatif de $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ selon (13).

III - CHIMIE de la RUBREDOXINE -

A/ - Caractéristiques spectrales - Fig. 2

Les rubredoxines isolées jusqu'alors sont de couleur rouge orangée à l'état oxydé. La figure n° 2 représente les spectres UV-visible de la rubredoxine Clostridium pasteurianum ; la lettre A désigne le spectre oxydé, la lettre B, le spectre réduit. La rubredoxine oxydée présente des maxima d'absorption caractéristiques aux longueurs d'ondes

de 490-497 m μ , 375-380 m μ , 355 et 280 m μ ; on constate un épaulement à 565 m μ . A l'état réduit, le spectre devient beaucoup moins riche en pics dans la région de la lumière visible et par contre, il s'enrichit du côté de faibles longueurs d'ondes. Il apparaît des maxima d'absorption à 333 m μ , 311 m μ et 275 m μ . D'après différentes études, le critère de pureté spectrale, généralement retenu après plusieurs cristallisations, est le rapport DO 280/DO 490 qui est situé entre 2,3 et 2,4. On se sert de cette mesure spectrale pour suivre la purification de la protéine. Jusqu'alors il n'a pas été montré qu'une des rubredoxines isolée chez les différents microorganismes étudiés présentât un spectre différent de celui obtenu pour les rubredoxines de Clostridium pasteurianum. Le spectre réduit est en général obtenu soit par traitement avec du dithionite de sodium convenablement équilibré et dosé en tampon de pH neutre, soit par action d'une hydrogénase ou d'extraits contenant cette enzyme. On constate dans tous les cas une disparition totale de la couleur rouge et du maximum d'absorption à 490 m μ dans des conditions d'anaérobiose. La solution de leuco-rubredoxine ainsi obtenue est très sensible à l'oxygène atmosphérique. Ainsi, lorsqu'on laisse l'air accéder à la surface de la solution, on constate la formation d'un anneau de couleur rouge dans la zone superficielle. En général, on obtient de nouveau le spectre initial oxydé, avec parfois quelques pertes d'absorption à 490 m μ car le produit se conservant mal à température ambiante est sujet à dénaturation partielle. Néanmoins, on peut dire que l'oxydation et la réduction de la rubredoxine sont des processus réversibles quant à leurs manifestations spectrales.

Chez Clostridium pasteurianum, (4) (13), les coefficients d'extinction moléculaires ont été calculés pour les différentes longueurs d'ondes (cf TABLEAU II).

$\lambda_{m\mu}$	490	380	332	311	280	275
oxydée	$8,85 \cdot 10^3$	$10,8 \cdot 10^3$			$21,5 \cdot 10^3$	
réduite			$6,31 \cdot 10^3$	$10,81 \cdot 10^3$		$24,31 \cdot 10^3$

TABLÉAU II : Coefficients d'extinction moléculaires de la rubredoxine aux différentes longueurs d'ondes (4) (13).

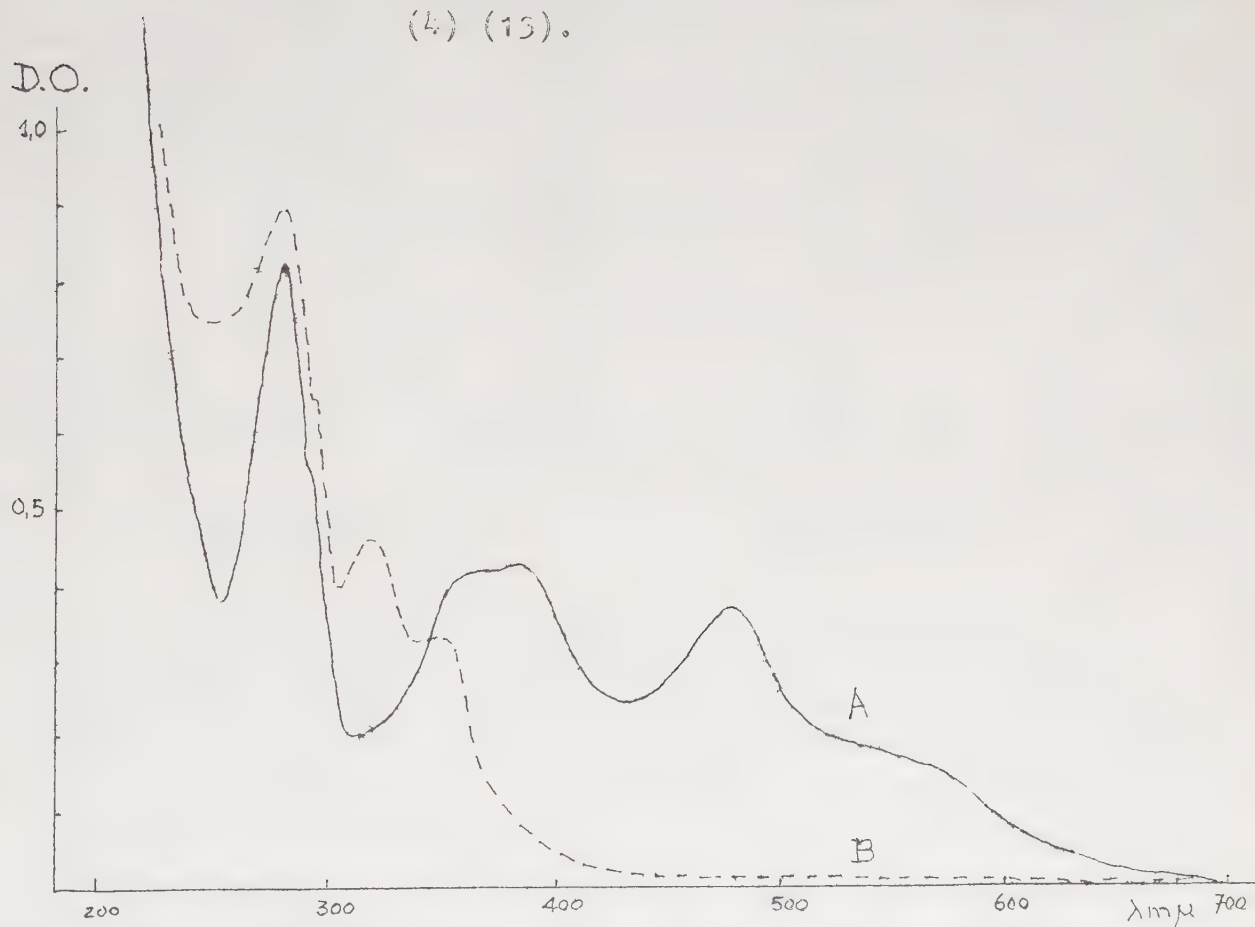


FIGURE N° 2 : Spectre UV-visible de la rubredoxine de Clostridium pasteurianum (—) oxydé (4) (4)
(---) réduit (2)

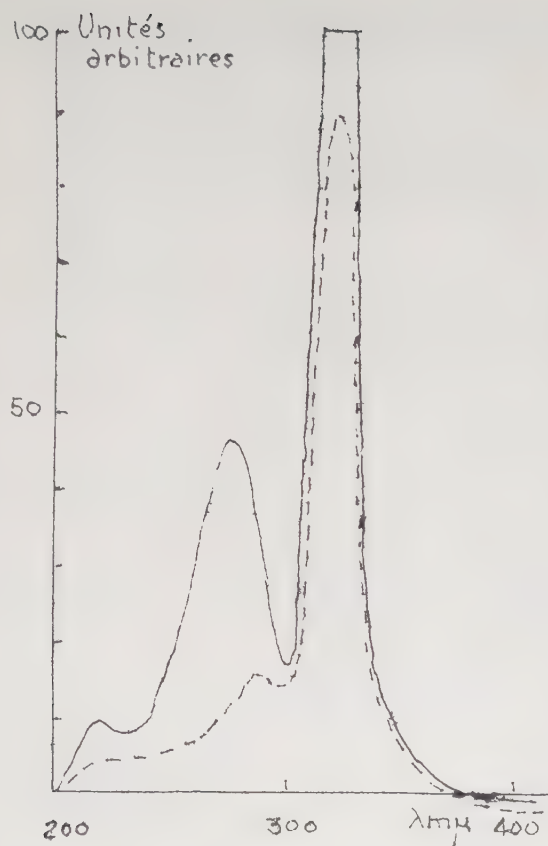


FIGURE N° 3

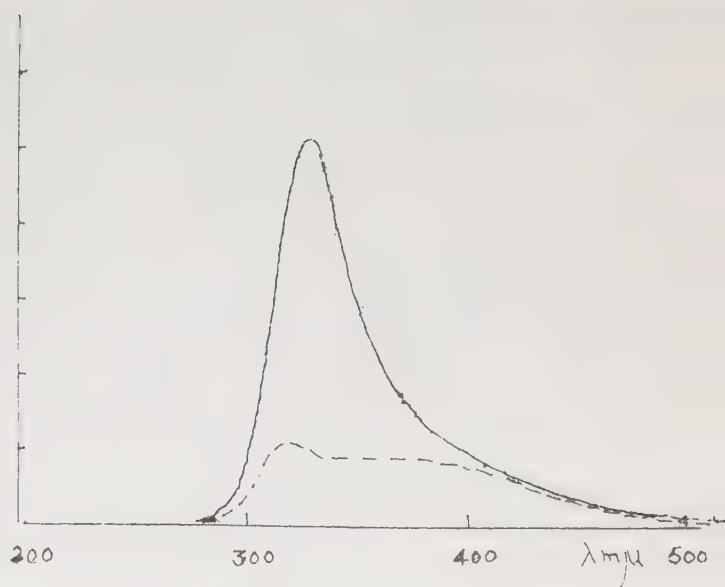


FIGURE N° 4

D'après LOVENBERG et SOBELL (4), la rubredoxine a des propriétés de fluorescence d'une protéine contenant du tryptophane. Les spectres d'excitation et de fluorescence sont indiqués dans les Figures 3 et 4. Il est intéressant de voir que le taux de tryptophane mesuré en fluorescence représente seulement 10 % de celui obtenu avec des solutions contenant des quantités équivalentes de tryptophane libre. Les auteurs expliquent ce phénomène comme une conséquence probable de la forte absorption de la rubredoxine dans la région de 340 mμ.

3/ - Propriétés Physiques et Chimiques

1°/ - Propriétés Générales -

a) - Poids moléculaire

Les rubredoxines isolées jusqu'alors sont des protéines de très faible poids moléculaire. Le tableau n° III montre les deux types de valeurs enregistrées lors des différents isollements effectués.

Origine	Coef. de sédim. en Svedbergs ($S_{20, w}$)	Vol. spé- cifique partiel $\bar{v}$	Poids moléculaire			
			Par vit. de sédim.	Equil. de sédim.	Analyse des A.A.	Poids moléc. moyen
<i>Cl. pasteurianus</i> LOVENBERG SOBEL (4)	-	0,70 0,60	- -	7.400 5.900	6.000	6.000
<i>Pseudomonas</i> <i>oleovorans</i> PETERSON-CONN (11)	$1,66 \cdot 10^{-3} \text{ xsec.}$ Coef. Dif. $11,7 \times 10^{-7} \text{ xsec.}^{-1}$	0,70	12.000	12.000	15.600	12.000
<i>Desulfovibrio</i> <i>desulfuricans</i> "Berre S" (8)	-	-	-	-	Anal. A.A. 6.500 $\pm$ 300	6.500

TABLÉAU N° III : Masses moléculaires calculées pour des rubredoxines d'origines différentes.

Bien que de masse moléculaire d'environ le double de celle mesurée chez les anaérobies, la rubredoxine ayant pour origine Pseudomonas oleovorans (11) (7) possède un spectre UV-visible tout à fait comparable à celui de la rubredoxine de Clostridium pasteurianum (4). Sa pureté a été vérifiée par électrophorèse. En fait, nous verrons ultérieurement que contrairement à la rubredoxine d'anaérobie, celle de Pseudomonas contient deux atomes de fer et présente deux signaux en résonance paramagnétique, l'un à $g = 4,5$ et l'autre à $g = 9,4$.

b) - Potentiel d'oxydo-réduction

La première mesure du potentiel d'oxydo-réduction de la rubredoxine a été faite par LOVENBERG et Coll. (4) selon la méthode modifiée de STOLTZ, SIDWELL et HOGUESS (14). Cette même méthode a été appliquée pour le calcul du potentiel normal d'oxydo-réduction (E_0 pH₇) de Pseudomonas oleovorans (11).

Ces résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Source	E_0 pH ₇ en volts à 25° C	nb d'électrons transf. par molécule
Cl. pasteurianum (4)	- 0,057	1
Pseudomonas P. oleovorans (11)	- 0,037	2
Désulfovibrio désulfuricans (8)	$0,011 < E_0 \text{ pH}_{7,5} < 0,081$	1

TABLÉAU N° IV : Potentiel redox de la rubredoxine.

La détermination du nombre d'équivalents (N) transférés par mole de rubredoxine de façon stoechiométrique est faite avec le système suivant : NADPH, H^+ , rubredoxine, 0,1 M TRIS pH 7,0 ; l'anaérobiose est réalisée par barbotage d'azote purifié pendant 1 heure ; 30 μ l d'extrait d'Epinard à 5 mg/ml contenant de la ferrédoxine-NADP-réductase sont isolés par un diaphragme. La réaction est mise en route par l'introduction de l'extrait enzymatique de façon anaérobie. On suit la densité optique à 325 m μ et 490 m μ .

$$\text{La valeur de N} = 2 \times \frac{(\text{moles NADPH ox.})}{\text{moles rubredoxine réduite}}$$

c) - Dosage du fer et du soufre (tableau N° V)

fer - L'évaluation de la quantité de fer présente par molécule de rubredoxine est pratiquée par plusieurs types de dosages classiques : Méthode à l'orthophénantroline, (en utilisant comme standard le sulfate ferreux ammoniacal), émission de flamme, absorption atomique, etc...

Groupelements Sulphydryles - Ils sont dosés en général par mesure de la variation de densité optique à 450 m μ avec des réactifs mercuriels tels que le mersalyle de sodium, le paramercuribenzoate et le paraphénylsulfonate.

Les SH labiles éventuels sont mesurés par la méthode de ELLMAN (15). Les principaux résultats publiés sont regroupés dans le tableau N° V.

Origine	Atomes de Fer/ moléc.	S H libres, labiles	SH liés actifs avec les merc./moléc.
<i>Cl. pasteurianum</i> (anaérobie)	1	0	4
<i>Micrococcus</i> <i>aerogenes</i> (anaérobie)	1	0	4
<i>Pseudomonas</i> <i>oleovorans</i> (aérobie)	1	0	non mentionné
<i>Peptostreptococcus</i> <i>elsdenii</i> (anaérobie)	1	0	4
<i>Desulfovibrio</i> <i>desulfuricans</i> (anaérobie)	1	0	4

TABLEAU N° V : Récapitulation des valeurs obtenues pour
les dosages de fer, -SH liés et -SH libres.

2°/ - Composition en Acides Aminés - Séquence -

Les études de composition en résidus acides-aminés sont faites à partir de méthodes classiques telles que l'ébullition à reflux à 110° C de la protéine en milieu HCl 6N. L'hydrolysat est analysé au bout de 12 H - 24 H et 48 H. Les résultats obtenus par analyse automatique avec les méthodes de STEIN et MOORE à la ninhydrine sont confrontés et l'on propose les nombres de résidus amino-acides par mg de protéine.

Le tableau N° VI ci-dessous résume la composition en acides aminés de différentes rubredoxines d'origine anaérobie.

Acides Aminés	Desulfo- vibrio desulfu- ricans S Berre	D.aero- genes	Cl. pas- teuria- num	D.lacti- lyticus	P.elsdi- nii	Ferred. Cl. pas- teuria- num
Lysine	4	2	4	4	4	1
Acide aspart.	7	3	12	5	9	3
Thréonine	2	2	3	1	2	1
Sérine	2	1	0	1	1	5
Acide glutam.	3	3	6	7	3	4
Proline	3-7	4	5	3	2	3
Glycine	6	5	6	5	5	4
Alanine	6	3	0	2	7-8	3
1/2 Cystine	4	4	4	4	4	3
Valine	5	4	5	3	3	6
Méthionine	1	1	1	2	2	0
Isoleucine	2	1	2	1	2	5
Leucine	0	3	1	1	1	0
Tyrosine	3	3	3	3	3	1
Phénylalanine	3	3	2	2	2	1
Tryptophane	1	1	2	2	1	0
TOTAL	60	53	56	51	52	47

TABLÉAU N° VI : Distribution des compositions en acides aminés des rubredoxines.

Si l'on compare la composition en acides aminés de la rubredoxine à celle de la ferrédoxine, on voit que pour une molécule de taille équivalente, il existe des différences très sensibles. En effet, deux des acides aminés principaux de la ferrédoxine de Clostridium pasteurianum (16) sont manquants dans la rubredoxine. Il s'agit de l'alanine et de la sérine. Par contre, la méthionine et le tryptophane manquant dans la ferrédoxine, sont présents dans la rubredoxine.

On constate aussi que contrairement aux ferrédoxines des anaérobies (17) la composition en acides aminés est plus riche en éléments basiques (4 lysines au lieu de 1 ou 0 pour la ferrédoxine).

Cette différence de composition en acides aminés peut permettre de suivre de manière très précise la purification de la rubredoxine où la technique est très proche de celle utilisée pour la ferrédoxine.

En outre, il est remarquable que le nombre de résidus cystéiniques soit constant dans chacune des compositions données ci-dessus. Nous verrons ultérieurement l'importance de ces résidus dans l'étude du site actif de la rubredoxine.

Séquence : Comparaison des séquences d'acides aminés de la rubredoxine de Micrococcus aerogenes (18) et de la rubredoxine de Leptostreptococcus elsdonii (18)

Met	-	Asp	-	Lys	-	Tyr	-	Glu	-	Cys	-	Ser	-	Ile	-
Met	-	Glu	-	Lys	-	Phe	-	Glu	-	Cys	-	Thr	-	Leu	-
1		2		3		4		5		6		7		8	

Cys	-	Gly	-	Tyr	-	Ile	-	Tyr	-	Asp	-	Glu	-	Ala	-
Cys	-	Gly	-	Tyr	-	Ile	-	Tyr	-	Asp	-	Pro	-	Ala	-
9		10		11		12		13		14		15		16	

Glu	-	Gly	-	Asp	-	Asp	-	Gly	-	Asn	-	Val	-	Ala	-
Leu	-	Val	-	Gly	-	Pro	-	Asp	-	Thr	-	Pro	-	Asp	-
17		18		19		20		21		22		23		24	

Ala	-	Gly	-	Thr	-	Lys	-	Phe	-	Ala	-	Asp	-	Leu	-
Gly	-	Asp	-	Gly	-	Ala	-	Phe	-	Glu	-	Asp	-	Val	-
25		26		27		28		29		30		31		32	

Pro	-	Ala	-	Asp	-	Trip	-	Val	-	Cys	-	Pro	-	Thr	-
Ser	-	Glu	-	Asn	-	Trip	-	Val	-	Cys	-	Pro	-	Leu	-
33		34		35		36		37		38		39		40	

Cys	-	Gly	-	Ala	-	Asp	-	Lys	-	Asp	-	Ala	-	Phe	-
Cys	-	Gly	-	Ala	-	Gly	-	Lys	-	Glu	-	Asp	-	Phe	-
41		42		43		44		45		46		47		48	

	-	Val	-	Lys	-	Met	-	Asp	-
Glu	-	Val	-	Tyr	-	Glu	-	Asp	-
49		50		51		52		53	

La chaîne de Peptostreptococcus elsdenii (15) ne comporte que 52 acides aminés. La superposition des deux molécules suggère soit un manque d'acide glutamique pour Peptostreptococcus elsdenii soit une addition en position 49 pour Micrococcus aerogenes.

En fait, bien que l'on retrouve des analogies pour des protéines qui par ailleurs présentent des propriétés physico-chimiques analogues, les différences demeurent grandes quant à la séquence.

L'analyse de séquence (19) est faite par des méthodes de découpage enzymatique de la S-aminoethylcystéinyl-rubrédoxine par la trypsine et la chymotrypsine dans le but de localiser les résidus cystéine dans les peptides. Ces peptides obtenus sont séparés par chromatographie sur tamis moléculaires et sur échangeurs d'ions, puis analysés après qu'on ait vérifié électrophorétiquement leur pureté et qu'on les ait hydrolysés, soit par voie enzymatique, soit par voie chimique. Le tryptophane est déterminé par la méthode spectrophotométrique de GOODWIN et MORTON (20).

Enfin, la détermination des résidus terminaux aminés et carboxyliques est effectuée respectivement par dinitrophénylation et hydrazinolyse, la localisation des autres résidus dans les sous-peptides est effectuée par digestion à la leucine-amino-peptidase, par action des carboxypeptidases A et B et par dégradation de DHAH.

2° - Etude Structurale -

a) - Etat d'oxydation du fer

La rubrédoxine contient entre 0,17 et 0,19 % de fer

par mg de protéine, ce qui équivaut environ à 1 molécule de fer par molécule de rubrédoxine. Cette appréciation est pour le moins valable en ce qui concerne les rubrédoxines extraites des anaérobies, tels que Clostridium pasteurianum, Desulfovibrio desulfuricans, Micrococcus aerogenes, Leptostreptococcus elsdénii, chez Pseudomonas oleovorans, organisme aérobie, d'après PETERSON et COON, (11) la quantité de fer serait double pour une molécule de rubrédoxine, mais la teneur sensiblement la même par mg de protéine. Des études ultérieures nous montreront sans doute s'il s'agit d'une molécule à structure différente, ou de la liaison de deux molécules comparables à celles trouvées chez les anaérobies.

L'appréciation du nombre de liaisons du fer dans le complexe = fer-protéine a été dosée chez Micrococcus aerogenes par action du chloromercuribenzoate sur la rubrédoxine, ce qui donne la courbe suivante d'après BACHMAYER et Coll. (10) (Figure N° 5)

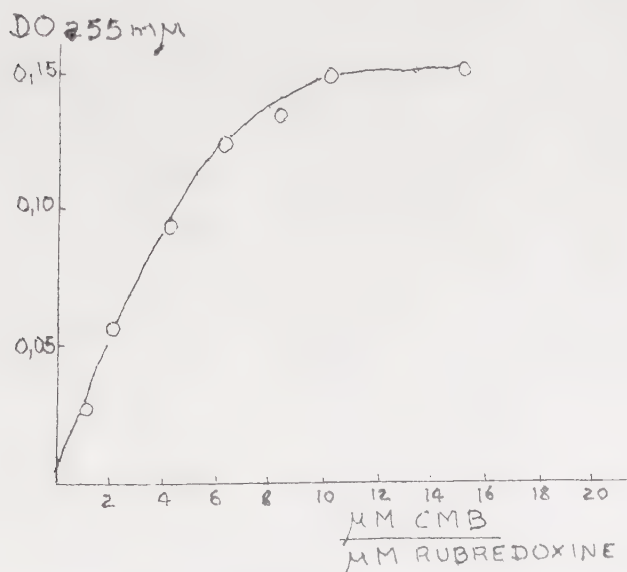


FIGURE N° 5 : Titration de la rubrédoxine par le C.M.B.

On remarque qu'un excès de C.M.B. est nécessaire dans la titration. Le phénomène est attribué au fait que le groupement (protéine - $(-S-)_4-Fe^{+++}$) doit être certainement transformé en groupement (protéine - $(S)_4-(Hg-R)_4$). Ainsi les liaisons (S-Fe) sont brisées alors que se forment des liaisons (S-Hg-R). La quantité de C.M.B. incorporée à la protéine est évaluée après dialyse du milieu réactionnel.

Le mercure est dosé par absorption atomique. Pour un rapport C.M.B./protéine = 4 on a trouvé que le produit contenait 2,45 H de Hg et pour un rapport de 10 il y avait 3,78 moles de Hg incorporées, ce qui est proche du chiffre 4, et ce qui indiquerait que 4 SH sont imbriqués dans la liaison.

b) - Nature des SH

Après l'étude des ferrédoxines qui renferment de grosses quantités de soufre minéral, les chercheurs ont essayé de trouver du soufre minéral dans la rubrédoxine. LOVENBERG et Coll. (4) n'ont pas trouvé de soufre minéral dans la rubrédoxine de Clostridium pasteurianum. Ces mêmes auteurs ont pensé que dans les conditions usuelles de dénaturation de la protéine, du soufre minéral pourrait échapper à la détection par exemple par une liaison éventuellement restante avec la protéine. Aussi ont-ils fait des analyses à température de 30° C. où l'on constate une dénaturation totale de la protéine. Il n'y a absolument pas de soufre d'origine minérale. Les mêmes constatations ont été faites pour les autres rubrédoxines.

Les SH ont pour seule origine les résidus cystéine de la molécule. BACHMAYER et Coll. (10) pensent, dans l'étude de la liaison chimique (Fer-S) dont nous avons vu l'exposé au paragraphe précédent, que si l'un des quatre SH supposés

intervenir dans la liaison du fer était libre, la courbe de titration de la rubrédoxine par le C.M.B. présenterait un point d'inflexion du fait que la combinaison du SH libre serait plus rapide que celle des SH liés. Or, comme le montre la courbe expérimentale, il n'en est rien.

En fait, le spectre UV-visible de la rubrédoxine native et de la CMB-rubrédoxine montre que les quatre résidus cystéine interviennent dans la chélation du fer (Fig. N° 6)

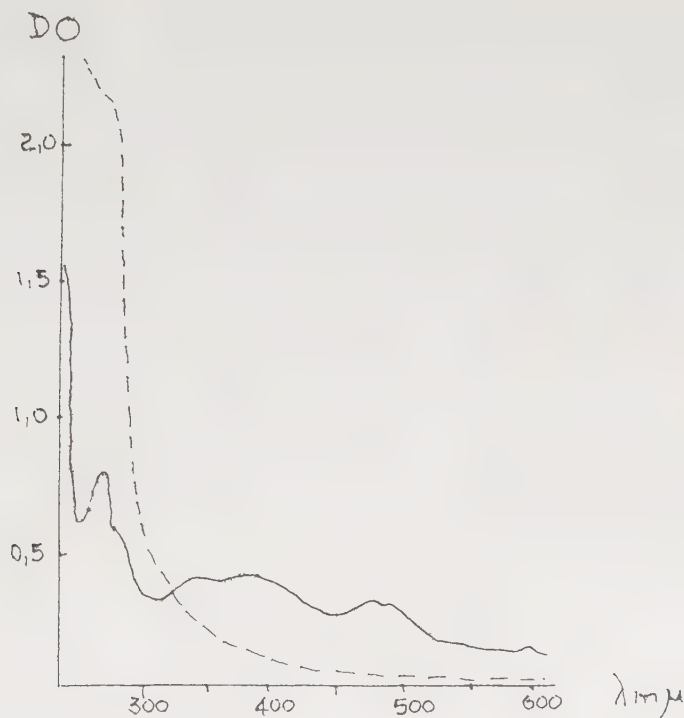


FIGURE N° 6 : Spectre d'absorption de la rubrédoxine native (—) et de la CMB-rubrédoxine (---).

LOVENBERG et WILLIAMS en 1969 apportent des conclusions tout à fait comparables quant aux propriétés chimiques de la rubrédoxine de Clostridium pasteurianum lors d'une étude ultérieure.

Les auteurs préparent de l'aporubrédoxine par action de l'acide trichloracétique à 0 %. La décomposition du chromophore fer est accélérée par chauffage à 50-60° C.

L'étude de l'aporubrédoxine en spectrophotométrie UV-visible (Fig. N° 9) a donné un maximum d'absorption à 280 mμ dont le coefficient d'extinction moléculaire est $\epsilon_{280} = 18,5 \cdot 10^4$ /mole/centimètre. Le spectre de dispersion rotatoire (Fig. 8) comparé à celui de la figure 7, indique qu'il s'agit typiquement d'une protéine. Le nombre de SH restant, trouvé par dosage au para-chloromercurobenzoate est de 2,7 résidus/molécule, ce qui est inférieur à la valeur trouvée dans la rubrédoxine native (10). Cette perte en SH est expliquée par une oxydation probable de groupements SH pendant la préparation de l'aporubrédoxine.

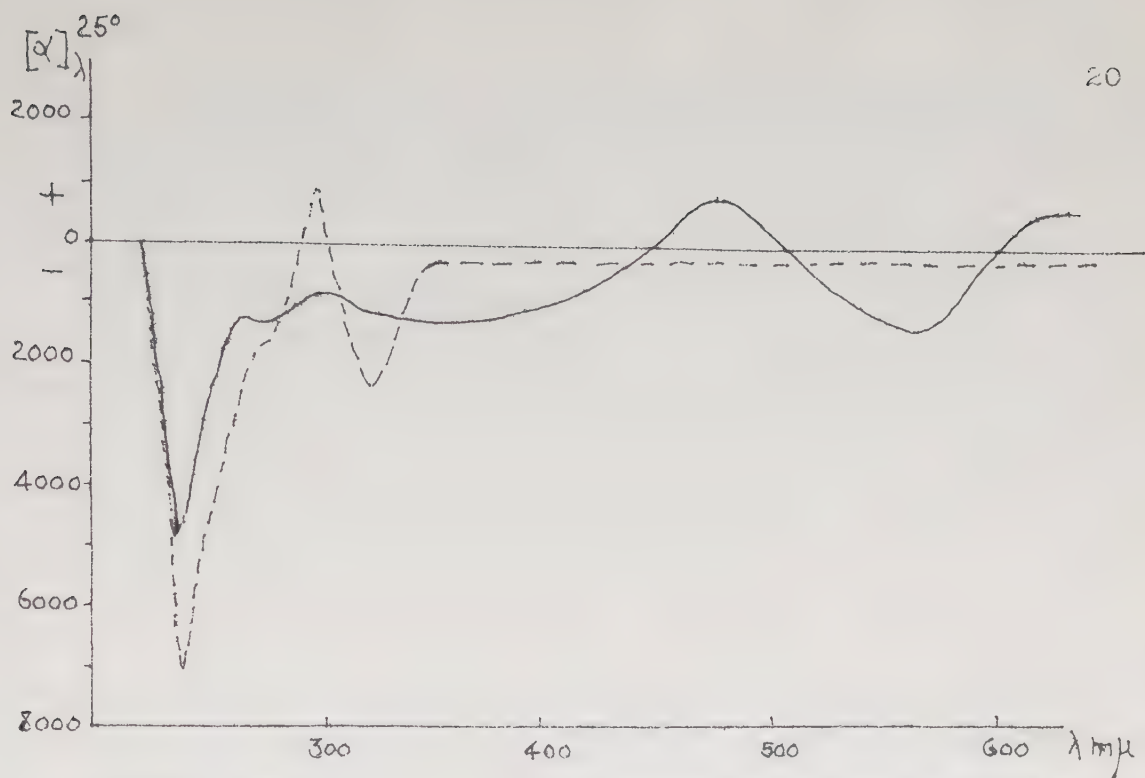


FIGURE 7 : Spectres de dispersion rotatoire de la rubrédoxine oxydée (—) puis réduite (---) par l'hydrogénase. (13)

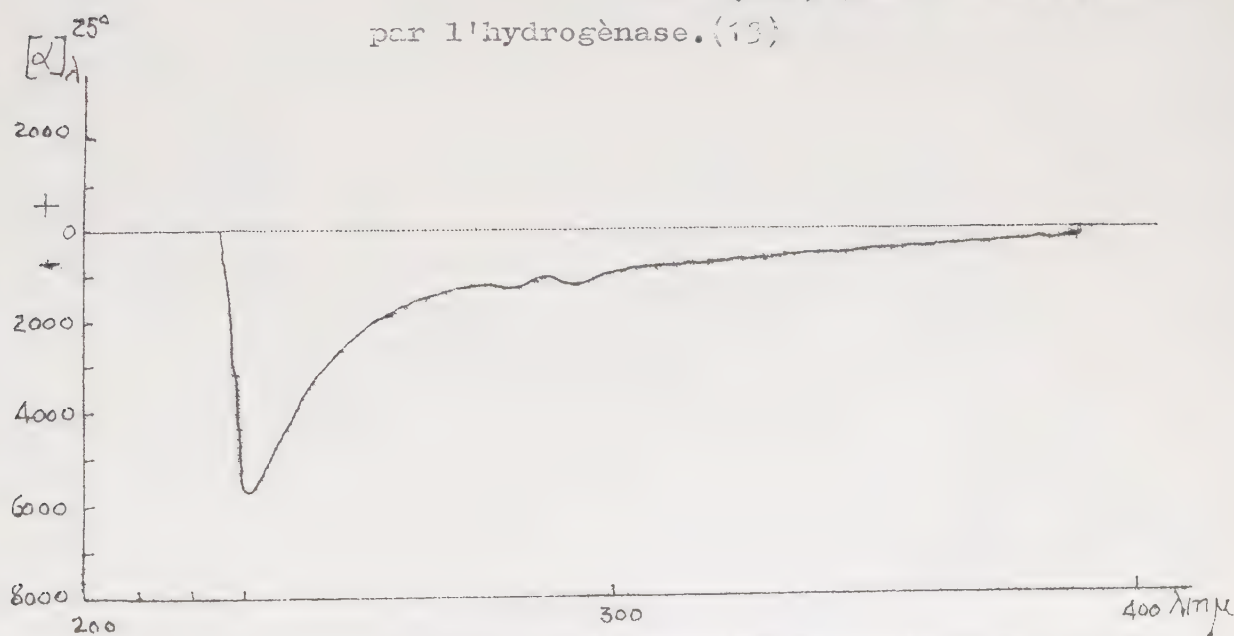


FIGURE 8 : Spectre de dispersion rotatoire de l'apo-rubrédoxine.

Le spectre a été obtenu avec 0,04 ml d'apo-rubrédoxine et 0,05 ml de 2,25 M glycine dans une cellule de 1 cm de trajet optique à température ambiante. La grande déviation λ_{max} est comparable à la rubrédoxine native.

L'étude de la localisation des résidus cystéine et du nombre de SH de liaison avec le fer par les réactifs mercuriels débouche sur les mêmes conclusions que celles rapportées par BACHMAYER et Coll. (10) pour la rubrédoxine de Micrococcus aerogenes, à savoir qu'il apparaît que les quatre cystéines sont présentes en tant que composés SH, qu'elles se comportent pareillement vis-à-vis des réactifs mercuriels, et que probablement elles sont responsables de la présence des maxima d'absorption à 320 et 490 m μ dans le spectre UV-visible de la rubrédoxine.

c) - Reconstitution de la rubrédoxine à partir de l'aporubrédoxine

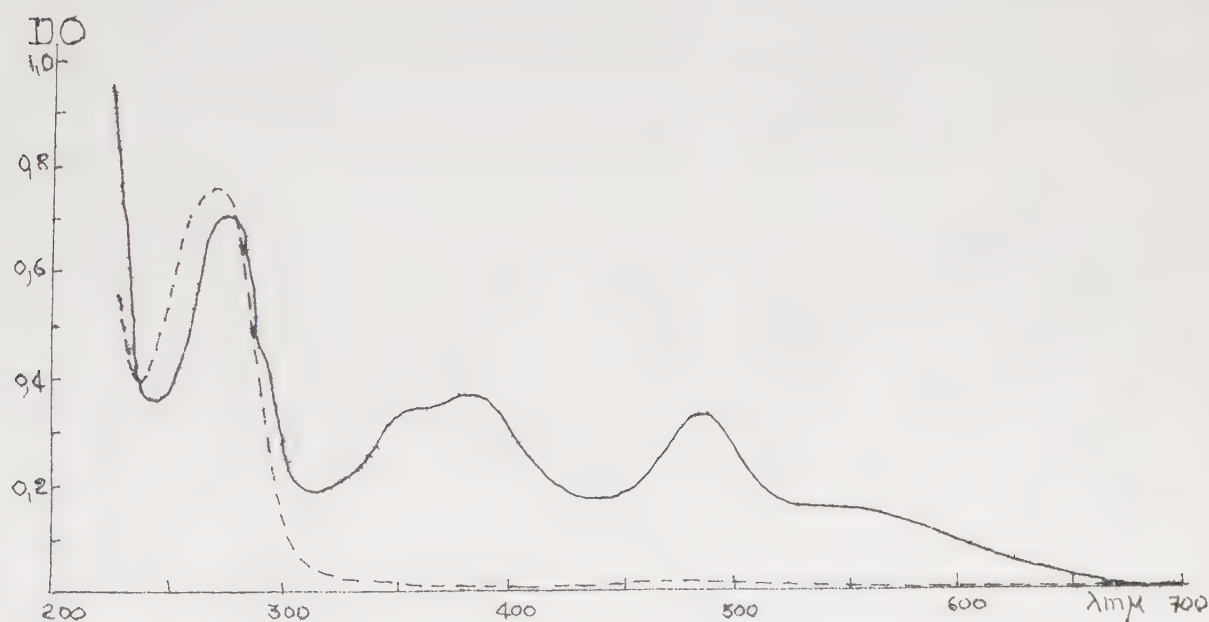


FIGURE 11° 9 : Spectre UV-visible de l'aporubrédoxine et de la rubrédoxine reconstituée.

— = rubrédoxine reconstituée.

- - - = aporubrédoxine.

Les cellules de mesure contiennent 0,05 ml de TRIS HCl pH 7,3. La concentration protéique est approximativement de 0,033 ml de rubrédoxine et 0,033 ml d'aporubrédoxine.

La manipulation a été effectuée par DOVARGANES et WILLIAMS en 1969 (15). Le milieu réactionnel est alcalinisé par de la triméthylamine jusqu'à pH 10 en présence de 2 mercaptoethanol ; le fer exogène est incorporé par traitement par le mélange sulfate d'ammonium et de fer. La présence nécessaire de 2 mercaptoethanol indique que les cystéines interviennent dans le mécanisme de liaison du fer.

c) - Nature de la liaison du fer

L'étude par résonnance paramagnétique de la rubrédoxine de Micrococcus aerogenes (10) a permis de connaître plus profondément la nature de la liaison du fer aux groupements sulphydrylés. La rubrédoxine par son seul atome de fer par molécule est beaucoup plus appropriée à cette étude que les autres molécules à fer non-hémique, telles que les ferrédoxines qui comportent 2 à 7 atomes de fer (17).

Origine	Valeur de g.			Etat d'oxydation de la protéine pour que le signal apparaisse
	1,54	4,3	9,4	
<u>Micrococcus aerogenes</u> (10)	-	+	-	oxydée
<u>Cl. pasteurianum</u> (13)	-	+	-	oxydée
<u>Desulfovibrio</u> <u>desulfuricans</u> (8)	-	+	-	oxydée
<u>Pseudomonas oleovorans</u> (11)	-	+	+	oxydée
<u>Ferrédoxine plantes</u> (17)	+	-	-	réduite

TABLÉAU N° VII : Comportement comparé de la ferrédoxine et de la rubrédoxine en traitement A.B.C.

- Etude en résonance paramagnétique (R.P.D.) : Le spectre de résonance paramagnétique de la rubrédoxine à pH 7,0 montre une résonance asymétrique en milieu oxydé pour une valeur de $g = 4,432$. Le spectre ne change pas de façon appréciable à pH 1,0, mais à des pH alcalins, la forme générale du spectre R.P.D. change. Cependant, l'intensité totale demeure identique (certains auteurs ont mentionné la stabilité en milieu acide de la rubrédoxine). Le signal devient plus symétrique, indiquant que les deux liaisons restantes, coordonnées au fer, sont modifiées.

Une telle dépendance du pH suggère que ces deux liaisons restantes sont peut-être dues à la tyrosine ou à l'amine libre d'une des lysines.

L'intensité du signal R.P.D. ne compte seulement que pour 15 % du contenu en fer assumant du fer de haut spin, lorsqu'on étalonne contre une solution standard Cu^{++} .

L'étude avec la rubrédoxine indique qu'un atome de fer est chélaté à quatre résidus cystéine ; on a montré que les résidus cystéine étaient en position 6,9,30 et 41 de la chaîne peptidique ; deux des résidus cystéine sont placés dans la région "NH₂ terminal" et deux dans la région "Coo H terminal" de la molécule. Deux autres résidus amino-acides sont intercalés entre les deux emplacements des résidus cystéine. Le fer peut alors servir à tenir la molécule de part et d'autre comme on le montre sur la figure II° 10.

Généralement, les protéines à fer non-hémique ont des résonances pour des valeurs de $g = 1,94$ ou $g = 4,3$. Les ferrédoxines appartiennent à la première classe et donnent

des valeurs de résonance pour $g = 1,94$ en milieu réduit, alors qu'on a trouvé que la rubrédoxine donnait des résonances pour $g = 4,3$ en milieu oxydant. L'état d'oxydation du fer responsable du signal à $g = 1,94$ pour les ferrédoxines demeure inconnu.

Le fer (III) de haut spin dans des champs orthogonaux montre de façon caractéristique des signaux E.P.R. dans la région de $g = 4,3$ et c'est pourquoi on considère qu'il est la source du signal observé avec la rubrédoxine. De tels signaux ont été obtenus à partir d'un certain nombre de composés non protéiques.

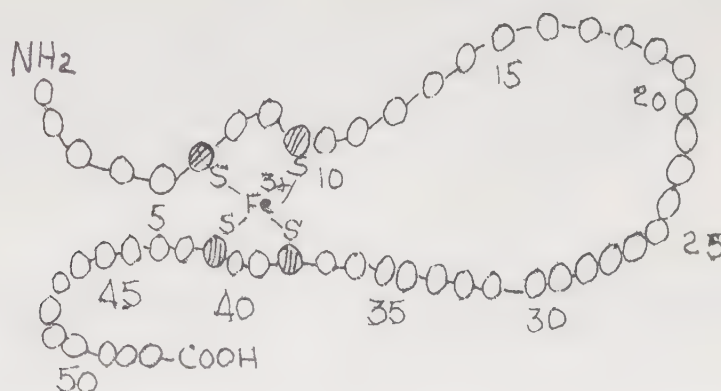


FIGURE N° 10 : Représentation schématique montrant les liaisons du fer dans la rubrédoxine de Micrococcus aerogenes. Les cercles représentent des résidus amino-acides. Les cercles ombrés en position 6, 9, 38 et 41 représentent les résidus cystéine.

e) - Conclusion sur l'Etude structurale

En résumé, l'analyse quantitative des groupements SH, la localisation des résidus cystéine dans la molécule, l'étude de la résonance paramagnétique de la molécule en fonction des variations enregistrées avec le pH, suggèrent qu'un atome de fer dans la rubrédoxine d'origine anaérobie est lié par coordinance de façon tétraédrique à quatre groupements sulphydryls provenant des résidus cystéine placés en position 6.9.38 et 41 chez Micrococcus aerogenes. Il est en outre possible qu'une liaison supplémentaire soit présente entre le fer et des résidus tyrosine ou lysine.

Dans cette structure, le fer ne fonctionnerait pas seulement comme accepteur d'électrons, mais encore comme stabilisateur de la configuration moléculaire.

IV - APPLIQUES GENETIQUES avec d'AUTRES PROTEINES à FER NON-HEMIQUE :

Les FORREDOXINES (21)

Jusqu'alors, les généticiens n'ont pas encore pu étudier en profondeur les rubrédoxines.

En effet, les premières séquences d'acides aminés n'ont été élucidées que durant les cinq dernières années.

WEINSTEIN (21) a essayé de trouver des archétypes entre la rubrédoxine d'origine bactérienne et la forredoxine d'origine bactérienne et végétale. Partant des observations de BACHLAXER et Coll. (10) qui ont comparé les séquences de la rubrédoxine de Micrococcus aerogenes et celle de Peptostreptococcus elsdensis (18)

l'auteur pense que les rubrédoxines doivent présenter une duplication interne et peuvent être éventuellement rattachées aux ferrédoxines d'origine végétale.

L'étude de duplication et d'homologie de séquence est faite en superposant tout ou partie des peptides. On calcule la différence de base minimum par codon qui permet de voir si la corrélation est significative ou non.

D'après les travaux récents de MATSUBARA et Coll. (22) toutes les ferrédoxines connues pourraient trouver une même origine dans un modèle de base à 29 résidus AA, moyennant certains remaniements du modèle de base bien sûr. Connaissant l'analogie de fonction entre les ferrédoxines bactériennes et les rubrédoxines de même origine, l'auteur ne trouve cependant que peu de corrélation entre la ferrédoxine et la rubrédoxine de Micrococcus aerogenes, si ce n'est sur les positions de résidus cystéine.

Les meilleures corrélations sont obtenues entre la rubrédoxine de Micrococcus aerogenes et les ferrédoxines d'Algue (Scenedesmus) et de plante (Epinard) ; elles sont meilleures encore que celles entre ferrédoxine de Micrococcus aerogenes et ferrédoxine de Plantes. Il faudrait donc classer plutôt les rubrédoxines parmi les ferrédoxines d'origine végétale ; elles seraient en fait le pont entre les ferrédoxines bactériennes et végétales et pour cela devraient constituer une classe dans le groupe des ferrédoxines.

V - FONCTIONS de la RUBREDOXINE

A/ - Bactéries anaérobies

Chez les anaérobies tels que Clostridium pasteurianum, les cellules se procurent leur énergie chimique en dégradant par fermentation les composés carbonés. Durant cette fermentation, l'oxydation d'un substrat est couplée à la production d'ATP et de transporteurs d'électrons réduits qui sont tous les deux nécessaires pour la synthèse de nouveau matériel cellulaire. Les éléments carbonés nécessaires aux biosynthèses proviennent des intermédiaires de fermentation et du CO_2 . Le schéma ci-dessous résume ces concepts (Fig. 11).

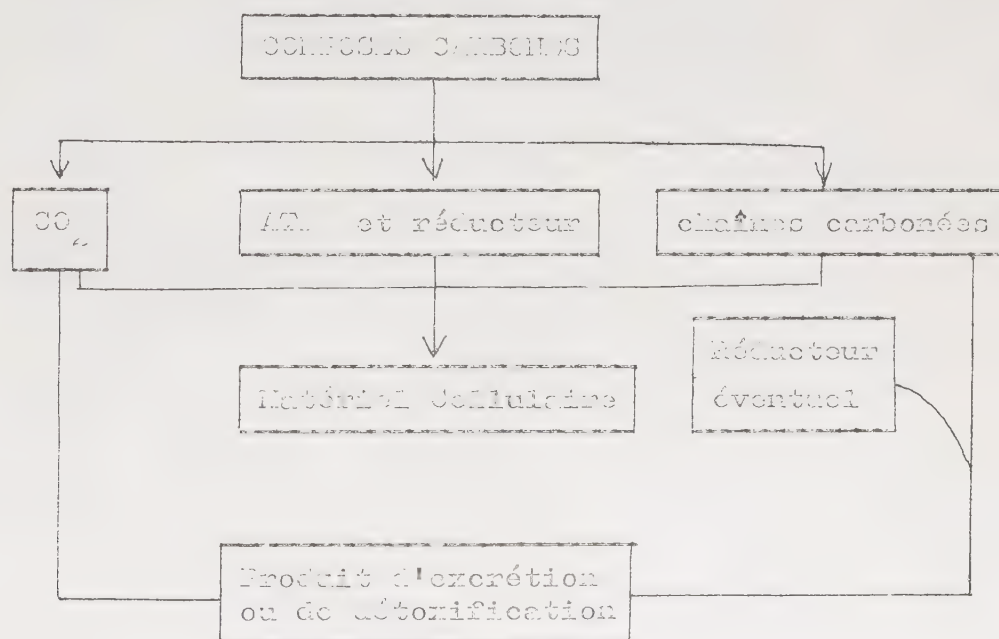
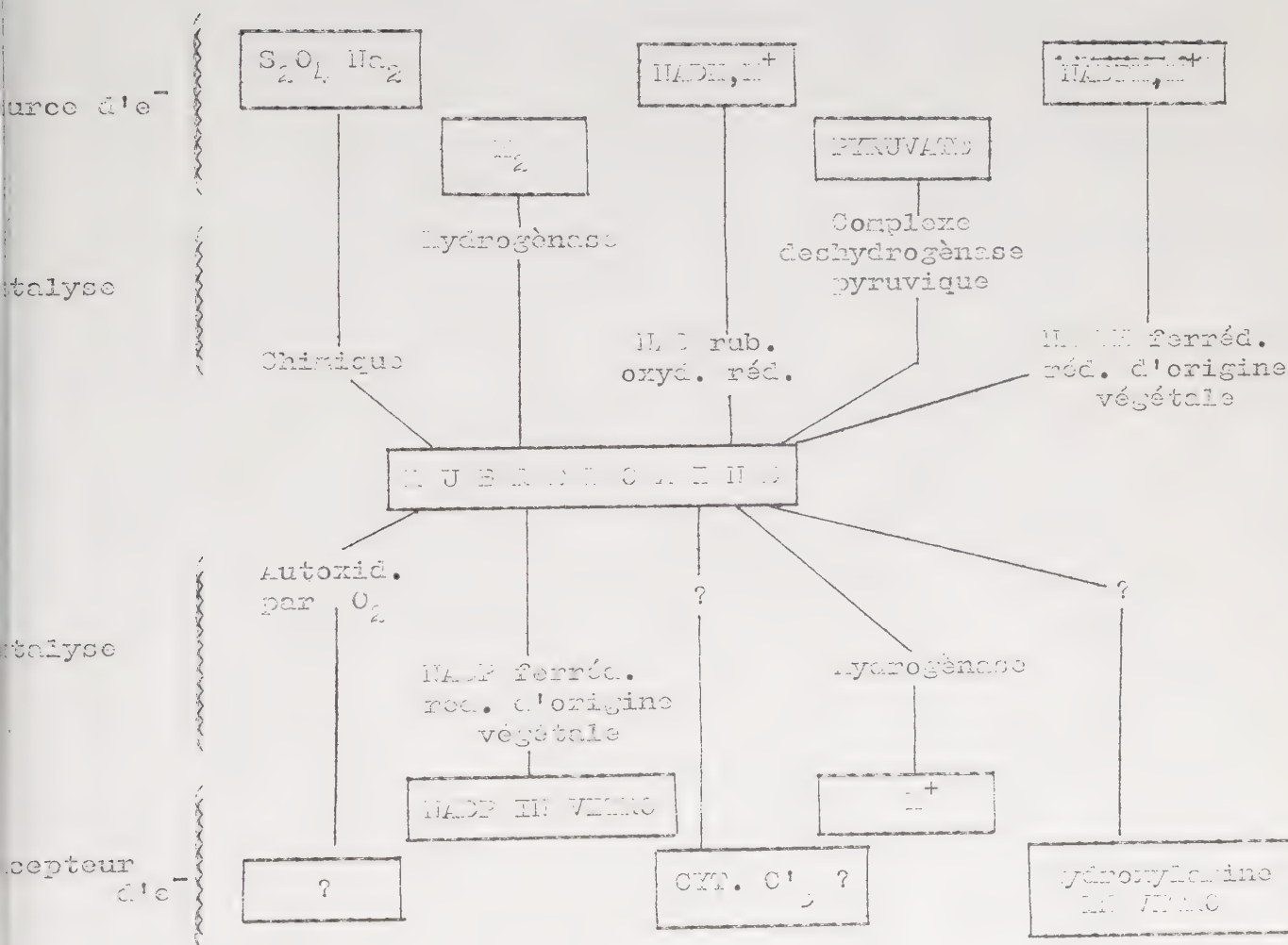


FIGURE N° 11 : Schéma du métabolisme des bactéries anaérobies.

Nous avons vu que la rubrédoxine appartient au "pool" des transporteurs d'électrons de la cellule ; nous allons maintenant essayer de connaître l'origine métabolique des électrons acceptés par la rubrédoxine et leur destination.

a) - Origine des électrons, réduction de la rubrédoxine

La rubrédoxine peut accepter des électrons de plusieurs sources comme on le voit résumé dans le tableau N° VIII suivant :



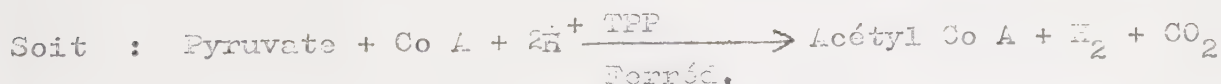
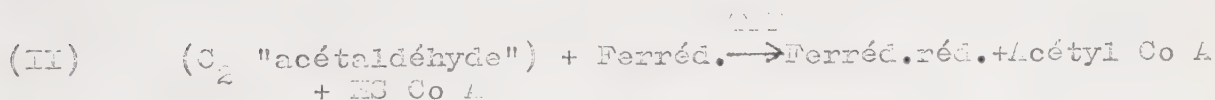
TABLERAU N° VIII : Principales oxydo-réductions de la rubrédoxine chez les bactéries anaérobies.

Lors de l'étude spectrale, nous avons signalé que la réduction de la rubrédoxine peut être obtenue par plusieurs voies. Tout d'abord chimiquement, le réducteur tel que l'ion $S_2 O_4^{2-}$ permet dans des conditions de pH acceptables, pour ne pas dénaturer ou flocculer la protéine, d'obtenir un spectre réduit caractéristique.

LOVENBERG et SOBEL (4) ont obtenu la réduction de la rubrédoxine par l'hydrogène et l'hydrogénase de Clostridium pasteurianum, par le pyruvate et le pyruvate deshydrogénase de Clostridium pasteurianum ainsi que par NADPH et la ferrédoxine NADP réductase de l'Epinard.

La réduction à l'aide du pyruvate est réalisée par l'essai de réaction phosphoroclastique où VALENTINE et Coll. (23) ont montré que la ferrédoxine de Clostridium pasteurianum était liée à l'oxydation anaérobie du pyruvate pour former de l'hydrogène.

La réaction s'écrit comme suit :



La rubrédoxine peut se substituer à la ferrédoxine (4) dans cette réaction chez Clostridium pasteurianum et comme on le voit dans la réaction (III) réversible, l'hydrogène, au moyen d'une hydrogénase peut très bien réduire la rubrédoxine (Fig. 12).

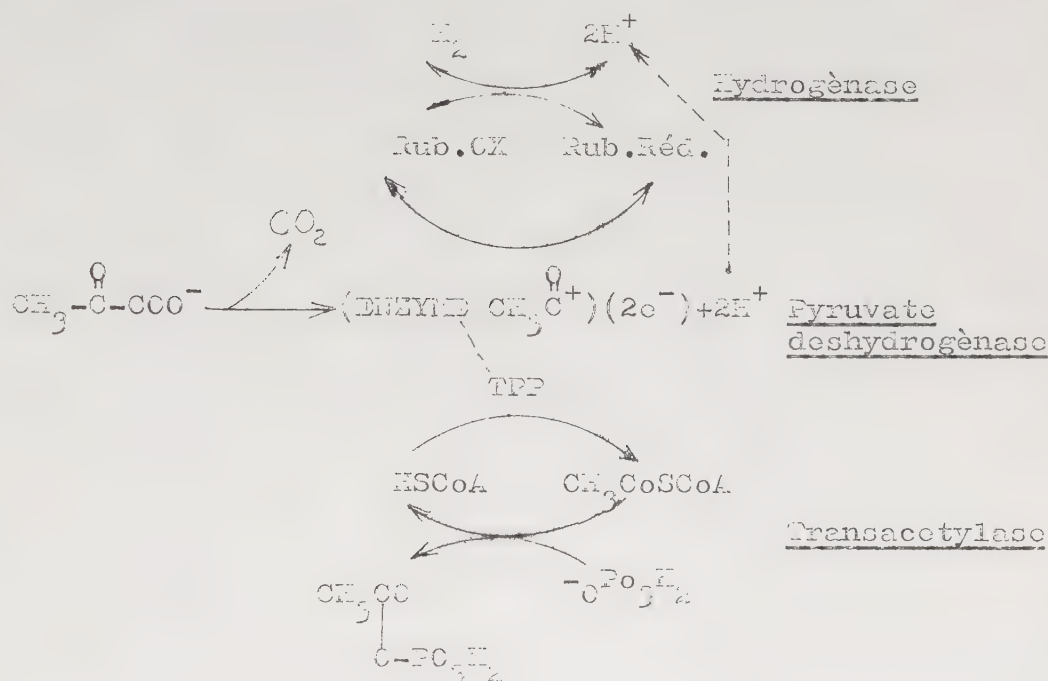


FIGURE N° 12 : Voie métabolique schématique montrant la substitution possible de la rubrédoxine à la ferrédoxine dans la réaction phosphoroclastique.

STADTMAN a étudié plus particulièrement la réduction de la rubrédoxine par NADH, H^+ , (5) catalysée par la NADH deshydrogénase purifiée de Clostridium sticklandii;

La figure suivante montre les résultats de l'expérience.

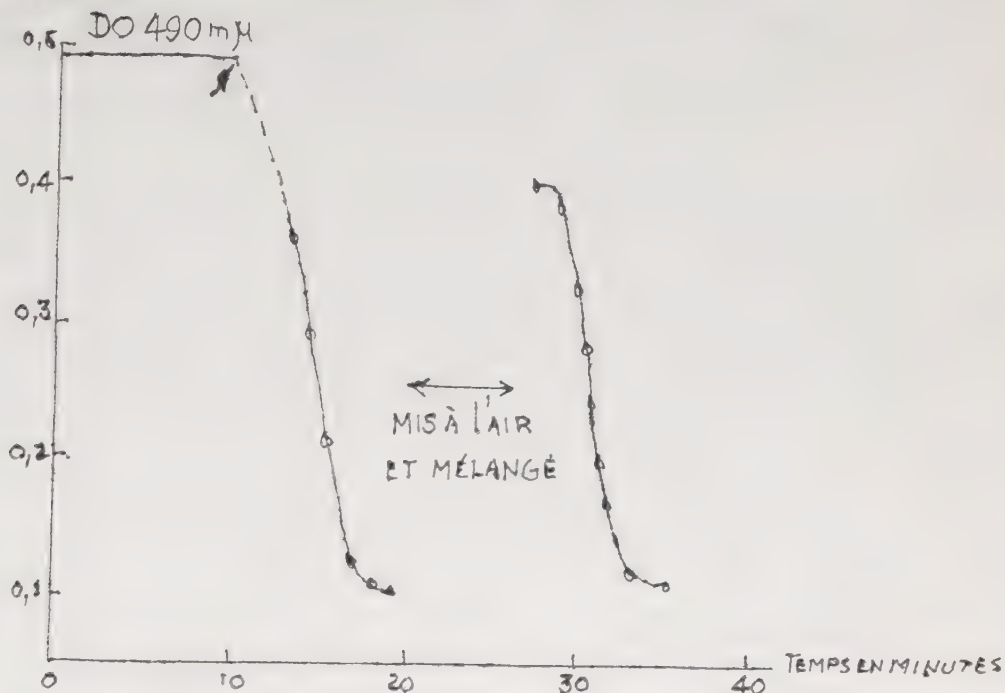


FIGURE N° 13 : Réduction de la rubrédoxine par la NADH deshydrogénase purifiée de Clostridium sticklandii (5).

Le système donneur d'électrons utilisé dans l'essai de la figure N° 13 est composé d'éthanol, de NAD^+ (0,6 μmole) et d'alcool deshydrogénase de foie de cheval.

Le système accepteur d'électrons a la composition suivante : 1,12 mg de rubrédoxine, soit 0,2 μ M (si l'on choisi comme masse moléculaire la valeur : 6000), 1 ml de milieu réactionnel pH 8 sous atmosphère d'hélium. La flèche indique le moment où la préparation de NADH-deshydrogénase est introduite de façon anaérobie dans le milieu réactionnel. Les mêmes vitesses sont enregistrées lorsqu'on utilise directement le coenzyme réduit NADH, en remplacement du système générateur de NADH à concentration moléculaire double.

STADTMAN a donc trouvé qu'une NADH deshydrogénase était liée de façon spécifique à la rubrédoxine. Une étude semblable a été faite par DE GALL sur les extraits acellulaires de *Desulfovibrio gigas* (24). L'auteur a purifié partiellement une enzyme capable de réduire la rubrédoxine en présence de NADH ; cette enzyme est inhibée par le parachloromercuri-benzoate, ce qui laisse présager que son site actif comporte des groupements sulphydrilés.

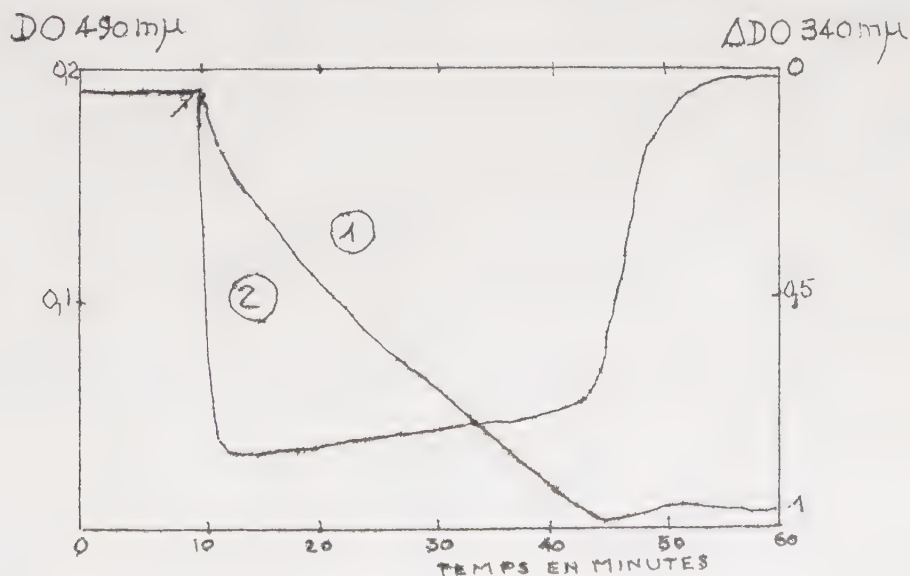


FIGURE N° 14 : Réduction de la rubrédoxine par NADH.

Courbe 1 = Variation de DO à 340 mμ (oxydation de NADH)
 Courbe 2 = Variation de DO à 490 mμ (réduction puis réoxydation de la rub.)

b) - Accepteurs possibles d'électrons donnés par la
rubrédoxine

LE GALL, (24) dans ses conclusions, indique que la rubrédoxine est capable in vitro de céder très faiblement des électrons au cytochrome $C'_{\frac{1}{2}}$. Néanmoins, connaissant la très grande réactivité de la rubrédoxine vis-à-vis du cytochrome C de mammifères, l'auteur pense que le cytochrome $C'_{\frac{1}{2}}$ de Desulfuvibrio gigas serait accepteur physiologique d'électrons provenant de la rubrédoxine moyennant une modification du potentiel rédox du cytochrome dans la cellule ; de plus, il pense que la rubrédoxine réduirait un cytochrome de plus haut potentiel que celui du $C'_{\frac{1}{2}}$. Cependant, ce cytochrome n'a pas encore été trouvé.

Pour les autres microorganismes, les essais ont permis de trouver des accepteurs tels que l'hydroxylamine ou encore $NADP^{+}$.

En renouvelant l'expérience de VALENTINE et Coll. (25) sur la ferrédoxine, LOVINGBRO et SCHUL (6) ont constaté qu'en substituant à la ferrédoxine, la rubrédoxine en quantité égale, dans la réduction de $NADP^{+}$ avec l'hydrogène par les extraits acellulaires de Clostridium pasteurianum, le rendement de la réaction tombait à 5 % du rendement original. Il semble donc qu'il y ait un manque de spécificité du système par rapport au transporteur d'électrons, ce qui est explicable par le potentiel rédox plus élevé de la rubrédoxine.

Enfin, citons que la rubrédoxine réduite par le système NADPH-ferrédoxine-réductase peut céder ensuite in vitro des électrons à l'hydroxylamine. Cette réaction a été faite avec des extraits acellulaires de Clostridium pasteurianum. Ces deux dernières réactions indiquent que la rubrédoxine participe à plusieurs oxydo-réductions biologiques pour lesquelles elle peut se substituer à la ferrédoxine in vitro. Néanmoins, nous ne lui connaissons pas encore de rôle spécifique. Seule, la possibilité d'un accepteur cytochrome C₁₃ chez Desulfuvibrio gigas nous permet d'envisager un début de chaîne de transport ; cependant, cela ne résout en rien le cas des bactéries dépourvues de système cytochrome.

B/ - Bactéries aérobies (genre pseudomonas)

En 1963, BAPTIST et Coll. (26) ont isolé du sol, une bactérie du genre Pseudomonas, appelée Pseudomonas oleovorans et poussant sur un milieu à l'hexane comme seule source de carbone. Les préparations d'extraits acellulaires de ce microorganisme sont capables de catalyser l'oxydation d'octane marqué ¹⁴C en acide octanoïque marqué ¹⁴C. Les auteurs ont montré qu'il est nécessaire d'ajouter un nucléotide pyridinique, afin que les extraits acellulaires traités sur charbon actif recouvrent leur activité oxydante vis-à-vis de l'octane. L'octanol et l'octanaldehyde se sont révélés être les intermédiaires de l'oxydation. En 1966, FERNERSON et Coll. (11) étudient la première étape de l'oxydation globale de l'octane en acide octanoïque, c'est-à-dire l' ω -hydroxylation de l'octane en n, octanol par le système enzymatique de Pseudomonas oleovorans.

On peut substituer l'acide dodécanoïque (ou laurique) à l'octane. La réaction d'hydroxylation se fait très bien avec ce dernier substrat. Les auteurs démontrent que le système est composé de trois protéines essentielles : la rubrédoxine, une NADH-rubrédoxine-réductase et une ω -hydroxylase. La réaction est faite en présence d'ions Fe^{2+} , de NADH et d'oxygène moléculaire. La spécificité du transporteur d'électrons a été étudiée particulièrement. On pourra lire dans le tableau IX suivant, les variations d'activité hydroxylante en fonction de l'origine du transporteur d'électrons.

Expérience	Source de la réductase	Protéine à fer non-hémique	Quantité d'octane hydroxylé
1	Epinard	Rubrédoxine (<i>Pseudomonas</i>)	50,7
	<i>Pseudomonas</i>	Rubrédoxine (<i>Pseudomonas</i>)	32,5
	Epinard	Rubrédoxine (<i>Pseudomonas</i>)	30,0
	"	Rubrédoxine (<i>Cl. pasteurianum</i>)	0,8
2	"	Ferrédoxine (<i>Cl. pasteurianum</i>)	0,3
	"	Ferrédoxine (<i>Cl. pasteurianum</i>)	5,1

TABLÉAU N° IX : Hydroxylations comparées de l'octane.

Remarque :

Tableau N° IX - dernière ligne :

Ligne Epinard au lieu de (*Cl. pasteurianum*).

On constate donc que, si la NADPH-ferrédoxine-réductase peut facilement être substituée à la NADH-rubrédoxine-réductase de Pseudomonas oleovorans dans la mesure où on lui fournit le coenzyme réduit approprié, la réaction d'hydroxylation quant à elle est hautement spécifique en ce qui concerne la protéine à fer-non-hémique. L'activité des rubrédoxine et ferrédoxine de Clostridium n'est pas significative et la ferrédoxine d'Epinard donne une activité qui est encore de beaucoup inférieure à celle obtenue avec la rubrédoxine de Pseudomonas.

Il semble donc que seule la rubrédoxine de Pseudomonas soit capable de réduire rapidement l'hydroxylase. Dans ce cas, la rubrédoxine aurait une fonction physiologique bien définie par sa participation aux réactions d'hydroxylation chez les aérobies tels que Pseudomonas. Ces résultats ont été confirmés par les travaux de KUSUNOSH et Coll. en 1967 (12). Ces mêmes auteurs ont mis en évidence (27) le rôle activateur de FAD dans la réaction d'hydroxylation. La figure 15 suivante montre que FAD semble être le meilleur activateur connu de la NAD-rubrédoxine-réductase.

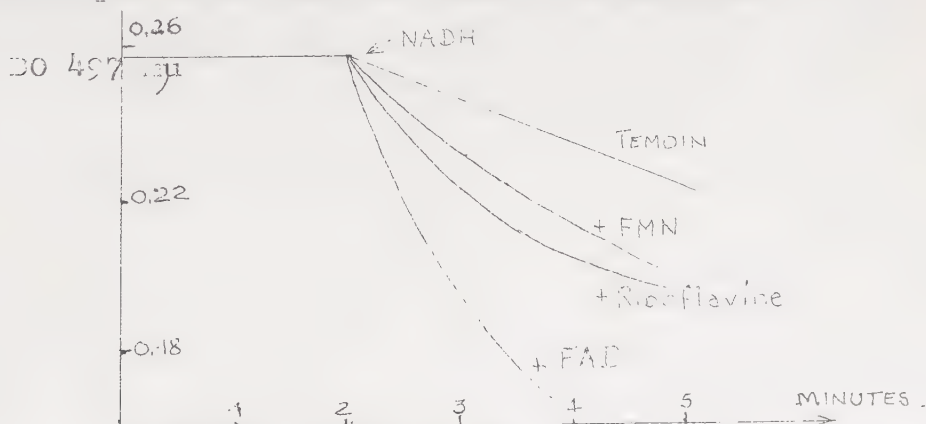
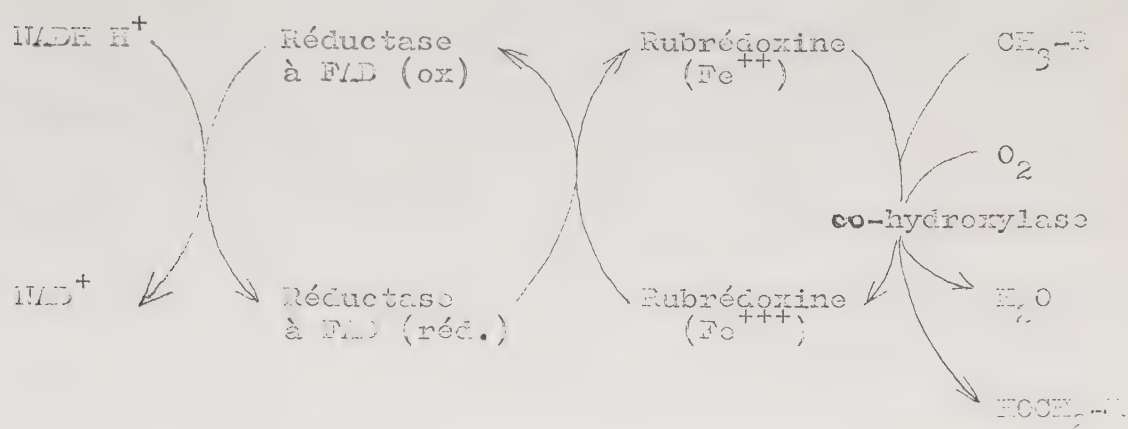


FIGURE N° 15 : Effet des flavines sur la réduction enzymatique de la rubrédoxine par la NAD-rubrédoxine-réductase. (27).

En définitive, PETERSON et Coll. (30) ont proposé le schéma suivant pour la voie d'hydroxylation des chaînes alkyl ou ω -carboxyalkyl.



R = résidu alkyl ou ω -carboxyalkyl.

— * * * —

Après avoir étudié les principales propriétés de la rubrédoxine, nous abordons l'exposé du travail expérimental qui nous a été confié et qui constitue la seconde partie du présent ouvrage.

— * * * —

PARTIE EXPERIMENTALE

I - MATERIEL et METHODESA/ - Cellules

Nous avons utilisé la souche ATCC 324 de Clostridium acetobutylicum. Ce microorganisme fabrique principalement de l'acétone et du butanol, à l'exclusion de l'acide acétique et de l'éthanol.

a) - Mode de culture

Le mode de culture des cellules a été mis au point par BERTHELIN (28).

Le milieu semi-synthétique utilisé à la composition suivante en pourcentage :

- Glucose	3 %
- Extrait de levure DIFCO	0,4
- $K_2 HPO_4$	0,05
- $MgSO_4$	0,05
- $Na_2 SO_4$ $7H_2O$	0,02
- $Fe SO_4$ $7H_2O$	0,001
- $Mn SO_4$ $5H_2O$	0,001
- $Na Cl$.	0,001

b) - Récolte et conservation des cellules

Les fermentations sont conduites en fermenteur thermostaté à 30° C. à l'abri de la lumière. Les cellules sont récoltées en fin de phase exponentielle de croissance au moyen d'une ultracentrifugeuse en continu Sharpless en prenant soin en fin d'opération de les maintenir en atmosphère de gaz neutre. Les cellules ne sont pas lavées pour éviter une perte de ferrédoxine ou de rubrédoxine dont on a pu constater la grande rapidité de diffusion. La conservation est réalisée par une congélation rapide dans un bain d'azote liquide et un stockage en congélateur à -50° C. On constate qu'un litre de bouillon de culture donne environ 1 g de cellules sèches.

B/ - Préparation de la rubrédoxine et de la ferrédoxine

a) - Obtention des Extraits acellulaires

Différentes techniques d'autolyse ont été essayées au Laboratoire afin d'obtenir des extraits acellulaires contenant la quasi totalité des protéines à fer non-hémique.

Le broyage cellulaire par ultrasons donne des extraits trop riches en protéines, ce qui complique les purifications ultérieures. L'autolyse aqueuse donne aussi des extraits assez riches et conserve l'activité protéasique forte de nos extraits. Nous avons retenu la technique de LAURENCE et SOBEL (4) consistant à faire une extraction dans le mélange eau-acétone à 50 %, ce qui favorise un dépouillement

très rapide des protéines inutiles et permet d'obtenir ainsi une pré-purification qui n'endommage pas les protéines telles que ferrédoxine et rubrédoxine.

L'extraction consiste en un traitement direct des cellules congelées qui sont ramenées à l'état de pâte visqueuse à 0° C. Cette pâte est diluée à raison de 1 volume pour deux volumes d'eau, à 0° et l'ensemble est complété volume à volume par de l'acétone distillé préalablement refroidi à 0° C.

Après 20 minutes de suspension cellulaire avec agitation vigoureuse, l'ensemble est centrifugé pendant 15 minutes à 15.000 g à température de 0° C. On conserve le surnageant qui est de couleur jaune-brun. Dans ces conditions là, plus de 95 % de la ferrédoxine est extraite ; des essais de nouvelle extraction sur les culôts de centrifugation ne nous ont révélé que la présence de traces de ferrédoxine.

b) - Chromatographie des Extraits acellulaires

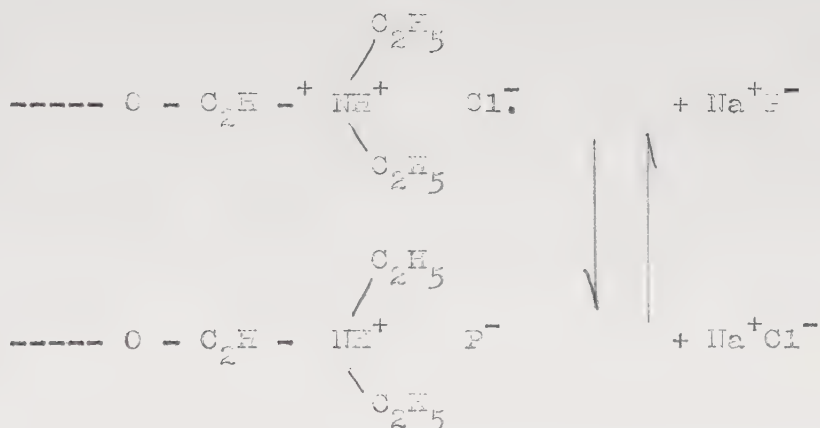
1) - Principe :

Nous avons mentionné dans la première partie de notre exposé que la ferrédoxine et la rubrédoxine sont très acidophiles. Néanmoins, la rubrédoxine qui possède quelques pôles basiques de plus que la ferrédoxine peut être désorbée avant celle-ci par "gradient de force ionique". Ce phénomène a été constaté dans toutes les études précédentes.

Nous avons donc conservé la technique de séparation sur Diéthyl-aminoéthylcellulose décrite par PETITDEMAINGE et Coll. (29) pour l'obtention de la ferrédoxine de Clostridium acetobutylicum en y apportant cependant quelques modifications quant au choix de la DEAE cellulose.

2) - Préparation des Colonnes :

Le mécanisme d'échange d'ions s'écrit comme suit:



F^- = pôle électronégatif.

Nous utilisons successivement les échangeurs fibreux Watman DE 23 et DE 11. Au cours des purifications, l'échangeur DE 23 s'est montré plus efficace pour la première adsorption. En effet, son pouvoir adsorbant est environ quatre fois supérieur à celui de DE 11 (400 mg/g contre 100 mg/g). Il semble que l'amélioration de la purification provienne de ce que la perte en adsorption irréversible est plus forte et qu'ainsi les protéines moins actives et déjà dénaturées soient écartées du produit en cours de purification.

De plus, la texture des DE 23 nous semble préférable pour le passage du mélange eau-acétone à 50 %, à la phase aqueuse. Nous avons pu constater qu'il se produisait moins de passages préférentiels lors du changement de phase, ce qui permet un meilleur lavage et une désorption plus appropriée des produits contaminants.

Les colonnes sont préparées selon les techniques recommandées par THOMPSON (31). L'essentiel consiste en un traitement acide-base ; le traitement acide est effectué en solution HCl 0,5 N pendant 60 minutes ; on lave jusqu'à ce que le pH remonte à 4 ou 4,5 ; le traitement basique est fait au moyen d'une solution NaOH 0,5 N pendant 60 minutes et l'on ramène le pH à 7 par lavage à l'eau distillée. Nous procédons à un dégazage nécessaire pour éliminer le CO_2 qui diminue la capacité d'échange d'ions de la DE 23.

L'échangeur est ensuite équilibré en tampon phosphate de potassium pH 6,5 à 0,5 de molarité. On sépare des fibres de tailles différentes par flottage et décantation, ce qui permet d'obtenir un échangeur d'ions très homogène qui assurera un tassement correct des colonnes, évitant les courants préférentiels et permettant ainsi une bonne chromatographie.

Avant la chromatographie, l'échangeur est lavé sur les colonnes avec 10 volumes d'eau distillée.

ape N° 1

ape N° 2

ape N° 3

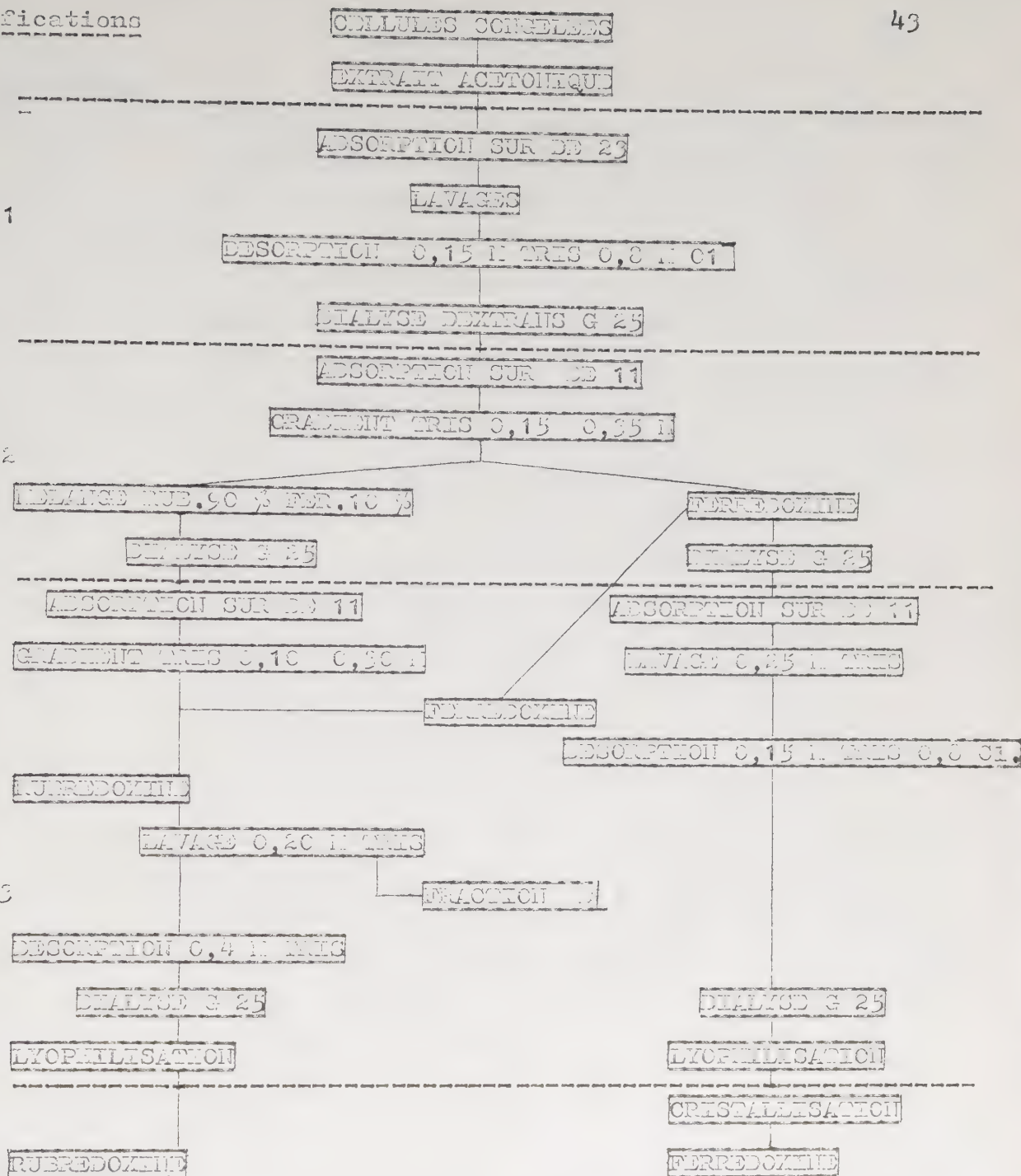


TABLEAU N° II : Schéma d'extraction et de purification de la Ferrédoxine et de la rubrédoxine. Manipulations en salle thermostatée à + 1° C. et à l'abri de la lumière solaire.

1ère Etape :

Elle consiste à séparer le mélange ferrédoxine-rubrédoxine de la majorité des protéines de l'extrait qui constituent des impuretés.

Après adsorption sélective de l'extrait acétonique sur colonne DEAE cellulose de 50 cm x 4 cm, la phase eau-acétone à 50 % est chassée par lavage de la colonne à l'eau distillée (environ dix fois le volume de la colonne) ; ensuite on élève progressivement la concentration de l'éluant en tampon TRIS, HCl pH 7,3, jusqu'à atteindre 0,15 M. On constate l'élution d'un anneau jaune, de nature flavinique. Les lavages sont poursuivis jusqu'à ce que la densité optique à 260 mμ des effluents soit inférieure à 0,100. En pratique, nous avons adopté la valeur 0,060 stable au moins pendant deux heures. Le mélange ferrédoxine-rubrédoxine ainsi lavé est élué par une solution de tampon 0,15 M TRIS HCl pH 7,3 + 0,55 M Na Cl. Le chlorure de sodium étant néfaste à la stabilité des protéines, l'éluat est immédiatement filtré sur une colonne de dextrans Sephadex : G 25 "fine" ; on obtient ainsi la fraction A. Le volume de rétention de la colonne est d'environ trois fois le volume de la solution à dialyser.

2ème Etape :

Au cours de celle-ci, nous partageons la fraction A en fractions B et C.

La fraction A est adsorbée sur colonne de DEAE-cellulose Whatman DE 11 qui provoque moins

d'adsorption irréversible que la DE 23. Les dimensions de la colonne sont $L = 20$ m $\varnothing = 2$ cm. L'anneau noir au sommet de la colonne est traité par une succession de tampons TRIS HCl, pH 7,3 dont on augmente progressivement la molarité. Le premier passage est effectué à 0,15 M pour une quantité égale à trois fois le volume de la colonne ; ensuite on ajoute trois volumes à 0,20 M, trois volumes à 0,25 M, trois volumes à 0,30 M, l'élution finale de la rubrédoxine étant obtenue avec le tampon TRIS HCl, pH 7,3, 0,35 M.

Pratiquement, on constate qu'à partir d'une molarité 0,25 M, l'anneau noir produit par la fraction A au sommet de la colonne se dédouble en deux zones de couleurs différentes : brune vers le sommet de la colonne (fraction B), rouge orangée vers la base de la colonne (fraction C). Cette dernière est élue jusqu'à recueillir une partie de la fraction B qui s'étale sur toute la colonne. La fraction C comprend alors environ 90 % de rubrédoxine et 10 % de ferrédoxine, mais la fraction ferrédoxine B est pratiquement pure comme le montre le tableau 17° XII de contrôle des purifications. La fraction B est élue par application de solution 0,15 M TRIS HCl, pH 7,3, 0,35 M HCl puis dialysée sur contreions.

3ème Etape : Traitement de la fraction B

Cette fraction est concentrée sur une colonne de 11 M $\varnothing = 2$ cm, puis lavée au tampon TRIS 0,25 M, afin de vérifier l'absence de rubrédoxine ;

celle-ci apparaîtrait sous forme d'un anneau rose à la base. Le cas échéant, il suffirait de reprendre la purification au niveau de l'Etape 2. En l'absence de rubrédoxine, la fraction B est ensuite éluée en 0,15 M TRIS HCl pH 7,3, 0,65 M NaCl, dialysée par filtration sur gel de dextrane, puis lyophilisée.

Traitement de la fraction C

La fraction C est adsorbée sur une colonne LS 11 L = 12 cm ϕ = 1,2 cm. Un gradient de TRIS dans des conditions identiques à celles de l'Etape 2, est alors appliqué. Le gradient débute à 0,1 M pour obtenir une migration nette de l'anneau rose avec 0,3 M TRIS HCl pH 7,3.

On constate alors qu'il apparaît trois anneaux sur la colonne (cf Figure 16 suivante).

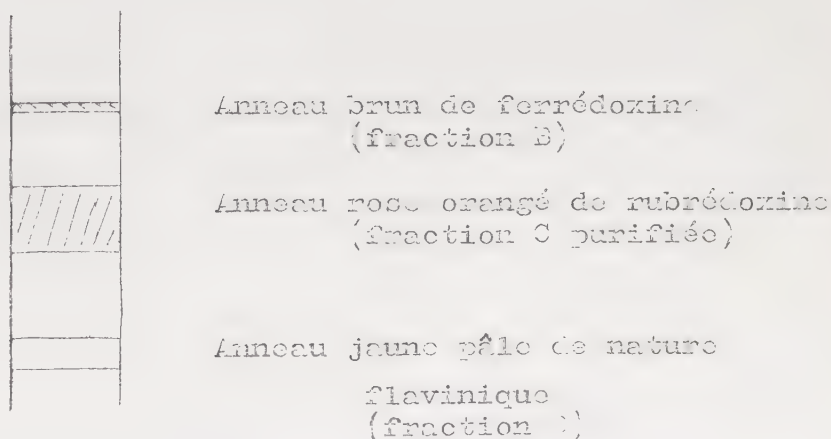


FIGURE N° 16 : 3ème Etape - chromatographie de la rubrédoxine.

L'anneau brun en sommet de colonne est composé de ferrédoxine. Il peut être récupéré et incorporé au cycle de traitement. A cet effet, on récupère l'anneau au sommet par prélèvement à la pipette.

L'élution de la fraction jaune D est ensuite poursuivie par lavage au tampon 0,25 M TRIS HCl, pH 7,3 ; la fraction C, purifiée, est éluée et concentrée par 0,4 M TRIS HCl, pH 7,3.

On la dialyse au moyen d'une filtration sur dextrans, et on la lyophilise.

Nous avons tracé le spectre UV-visible de la fraction D ; l'aspect général du spectre est voisin de celui d'une flavo-protéine (Figure 17)

Nous n'avons pas pu vérifier si ce produit présentait une activité enzymatique rubrédoxine NAD-oxydo-réductase ; en effet, nous avons obtenu des résultats négatifs pour ce test, qui toutefois n'est pas concluant, car la fraction D aurait pu facilement être dénaturée durant la préparation de la rubrédoxine.

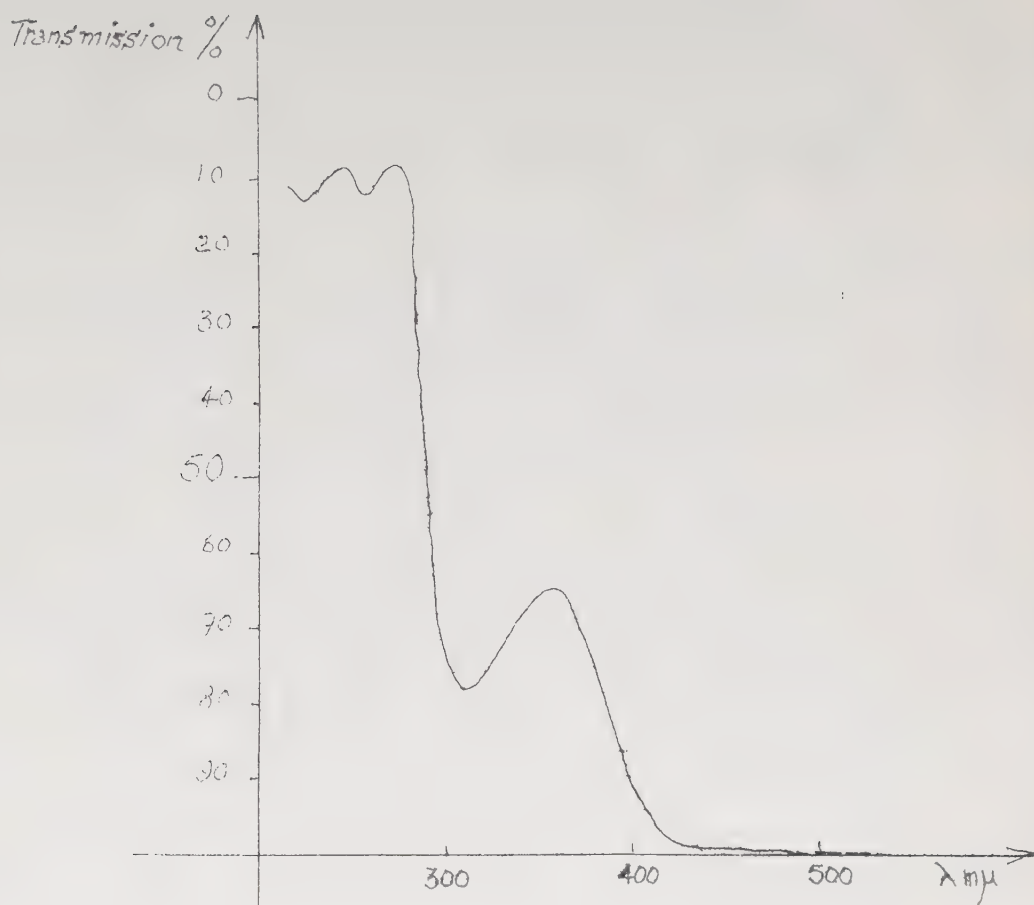


FIGURE N° 17 : Spectre UV-visible de la fraction D.

Il semble que cette impureté reste pendant longtemps étroitement liée à la rubrédoxine.

c) - Essais de cristallisations

Nous avons réalisé la cristallisation de la ferrédoxine en dissolvant 70 mg de ferrédoxine de rapport NO $\frac{390}{260} = 0,77$ dans 10 ml de tampon phosphate 0,01 M pH 6,5 et en plaçant cette solution en sac à

dialyse contre 6 l de sulfate d'ammonium à 75 % de saturation à 0° C. La concentration en sulfate d'ammonium a été élevée progressivement chaque jour jusqu'à atteindre 100 % de saturation à température de 0° C.

Au bout de trois semaines, nous avons constaté un dépôt de cristaux bruns foncés au fond du sac. L'examen au microscope révèle une forme de cristaux comparable à celle de ceux obtenus pour la ferrédoxine de Clostridium butyricum (16).

La cristallisation de la rubrédoxine a été tentée en précipitant entre 75 % et 95 % de saturation en sulfate d'ammonium à 4° C., 4 mg de la fraction C purifiée et lyophilisée. L'essai de cristallisation en présence de sulfate d'ammonium solide (selon la méthode de BACHMAYER)(10) s'est montré infructueux et nous avons constaté une rapide altération de la protéine avec perte de couleur au bout de 12 heures et apparition d'éléments floculés ne présentant plus les propriétés spectrales du produit initial. Les quantités de rubrédoxine dont nous disposions étant relativement faibles, pour tous nos essais, nous avons utilisé la fraction C lyophilisée de rapport moyen de purification $\frac{DO-280}{490} = 3,5$.

d) - Contrôle des purifications

1/ - Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode dite du Biuret, d'après GOMMALL et Coll. (24)

Pour suivre les purifications des protéines à fer non-hémique, nous avons utilisé la méthode 280/280 260 basée sur l'absorption de la lumière par la tyrosine et le tryptophane à 280 m μ dans des cuves de trajet optique = 1 cm (33).

Certes, la précision de cette méthode n'est pas très bonne, mais elle présente l'avantage de ne pas détruire les échantillons analysés, ce que ne permet pas la méthode du Biuret.

2/ - Dosage des acides aminés

Les acides aminés sont dosés au moyen de l'appareil Autoanalyser TECHNICON. L'élution a lieu à 60° C. sur une colonne de résine cationique sulfonée imprégnée de 3 % de divinyl-benzène, par application d'un gradient de pH : acide-neutre.

L'analyse quantitative automatique est faite contre étalon interne : norleucine par la méthode de STEIN et MOORE.

3/ - Biureté spectrale

A chaque étape de purification, les fractions sont testées au spectrophotomètre enregistreur Beckman DB.

La comparaison des spectres UV-visible obtenus avec les spectres des protéines de même nature obtenus chez d'autres microorganismes nous a permis d'apprécier l'état de pureté de nos produits, en comparant la netteté des pics d'absorption obtenus sur les bandes enregistrées.

4/ - Reproductibilité des essais

- Contrôle de l'état des chromophores des protéines à fer-non-hémique.

Les rapports de densité optique $\frac{DO\ 390}{DO\ 280}$ sont vérifiés pour la ferrédoxine. Plus ce rapport augmente, plus le produit s'approche de la pureté. En fait, la purification a pour effet de diminuer la quantité des protéines absorbant à 280 mμ et de concentrer le chromophore qui absorbe à 390 mμ.

Pour la rubrédoxine, le contrôle de pureté est effectué en calculant le rapport $\frac{DO\ 280}{DO\ 490}$. Les effets de la purification sur les densités optiques sont les mêmes que ceux exposés plus haut, la DO à 490 mμ étant liée directement au chromophore. Le rapport le plus faible donne la meilleure purification.

- Reproductibilité

Le tableau n° VII permet de vérifier la reproductibilité de nos essais d'extraction à grande échelle ; l'essai n° 1 ne nous a pas permis à la troisième étape d'obtenir une rubrédoxine suffisamment purifiée. Cette fraction a été traitée ultérieurement pour obtenir une valeur du rapport $\frac{DO\ 280}{DO\ 490}$ égale à 5,4. Nous avons obtenu les meilleurs rapports de purification et la perte la plus faible en protéines actives en partant des dépôts protéiques les moins denses. Il semble donc qu'à l'avenir il soit souhaitable de s'aligner sur les conditions de l'essai n° III de préférence.

C/ - Préparation d'extraits enzymatiques dépourvus de ferrédoxine

a) - Obtention

La conservation des cellules s'effectue dans un grand nombre de récipients contenant environ 6 grammes de cellules humides chacun. En opérant de la sorte, on évite que la totalité des cellules soient exposées à l'air lors de la prise d'échantillons.

Deux à trois grammes de cellules humides sont mis en suspension dans 10 ml de tampon phosphate de potassium 0,03 M, pH 7, saturé d'azote.

Pendant cette opération, les cellules sont protégées de tout contact avec l'oxygène par barbotage d'azote.

La suspension est centrifugée à 12.000 g. pendant 15 minutes à 4° C. Le tampon de lavage surnageant est éliminé. Il contient une grande partie de la ferrédoxine et de la rubrédoxine. Le culot de centrifugation est mis à nouveau en suspension dans 5 ml de tampon phosphate 0,03 M pH 7 dans les mêmes conditions que précédemment. Les cellules sont soumises à un traitement par sonation durant 5 minutes dans un générateur d'ultrasons 100 de fréquence 20 Kc. à 4° C. La solution est centrifugée à 12.000 g. pendant 10 minutes. Le surnageant est prélevé.

b) - Traitements

1/ - Élimination de la ferrédoxine et de la rubrédoxine

La ferrédoxine et la rubrédoxine sont extraites du milieu par passage de la solution sur une colonne

de DEAD-cellulose LB 11. Les dimensions de la colonne sont de $L = 6$ cm $\varnothing = 1,5$ cm. L'équilibrage est le même que celui utilisé pour la chromatographie (cf : E-b-2/). L'extrait est protégé de l'oxygène par circulation d'argon.

2/ - Activation des extraits

Les extraits traités sur DEAD-cellulose ou non traités sont activés par barbotage d'hydrogène. Ce traitement est nécessaire pour l'obtention d'une activité enzymatique convenable. Ces extraits sont conservés à 4° C. sous vide partiel.

3/ - Mesure des activités enzymatiques liées à la rubrédoxine

a) - Caractéristiques spectrales

1/ - Etude qualitative

L'évolution du chromophore de la rubrédoxine dans un milieu où l'état d'oxydoréduction est variable, est liée à l'évolution de la densité optique dans la région visible entre 325 et 550 m μ .

Les maxima d'absorption se situent à 380 et 490 m μ pour l'état oxydé (Fe^{3+}). L'étude qualitative est faite en enregistrant la densité optique dans la région visible au moyen d'un spectrophotomètre enregistreur Beckman D.

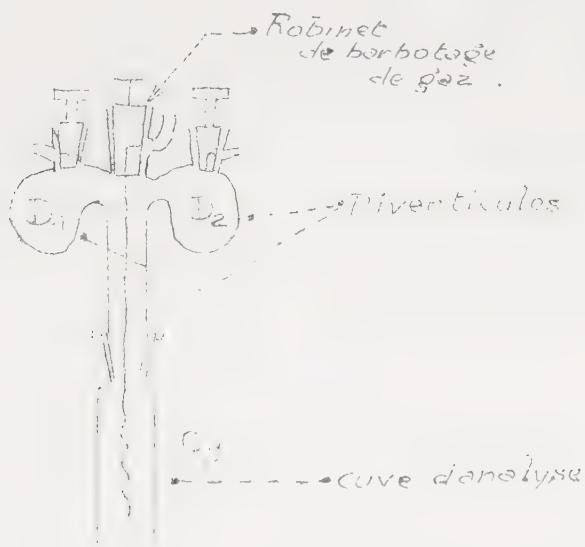
2/ - Etude quantitative

Basée sur le même principe que l'étude qualitative, cette étude est effectuée en mesurant les variations de densité optique à 490 m μ à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU. Le maximum d'absorption à 490 m μ est assez éloigné de l'extinction maxima caractéristique des nucléotides pyridiniques réduits, qui se situe dans la région 325 - 345 m μ , selon que ces donneurs d'électrons sont liés ou non aux protéines. Aussi, la bande à 490 m μ présente-t-elle une bonne résolution pour l'étude de la réduction de la rubrédomine.

b) - Dispositions pour obtenir des conditions d'anaérobiose stricte

1/ - Appareillage

Les essais enzymatiques sont réalisés dans des cuves spectrophotométriques en quartz de 1 ml de capacité pour 1 cm de trajet optique (HELLER type 128/4/F QS ; cf schéma suivant).



Cet appareillage est constitué de trois compartiments principaux = la cuve d'analyse spectrophotométrique C_S et deux diverticules D_1 et D_2 . Pour la suite de notre exposé, nous retiendrons pour simplifier les désignations précisées ci-dessus.

2/ - Mise en anaérobiose des constituants réactionnels

Après avoir réparti les différentes solutions dans les compartiments D_1 , D_2 et C_S , en atmosphère d'argon ou d'azote, l'ensemble est assujéti à une rampe à vide ; on abaisse progressivement la pression intérieure de l'ensemble jusqu'à 10^{-4} mm Hg. On considère que le dégazage des solutions est convenable après 20 minutes de ce traitement. La mise sous vide des solutions provoque leur concentration par évaporation ; aussi, faut-il calculer des volumes supérieurs d'environ 40 % au volume final souhaité. Le volume final des solutions recueillies dans le compartiment C_S est de l'ordre de 1,0 à 1,10 ml ; on le mesure à la seringue avec exactitude après les manipulations. L'évaporation sous vide provoque aussi un refroidissement qui nécessite une station de 10 minutes à température ambiante, ou à l'étuve, selon les températures recherchées. Après ces opérations, le vide est cassé sous argon pour éviter tout manque éventuel d'étanchéité de l'appareillage.

3/ - Activité spécifique des extraits

Nous avons retenu la définition suivante :

- Diminution de 0,001 de la densité optique à 490 m μ par minute et par mg de protéine. Les conditions de chaque expérience sont fixées ultérieurement.

c) - Réaction phosphoroclastique

Nous avons utilisé la méthode mise au point sur la ferrédoxine de Clostridium acetobutylicum par PETTYDENANCE (54).

II - RESULTATS

A/ - Ferrédoxine

a) - Aspect des cristaux - Spectre UV-visible (Fig. 16)

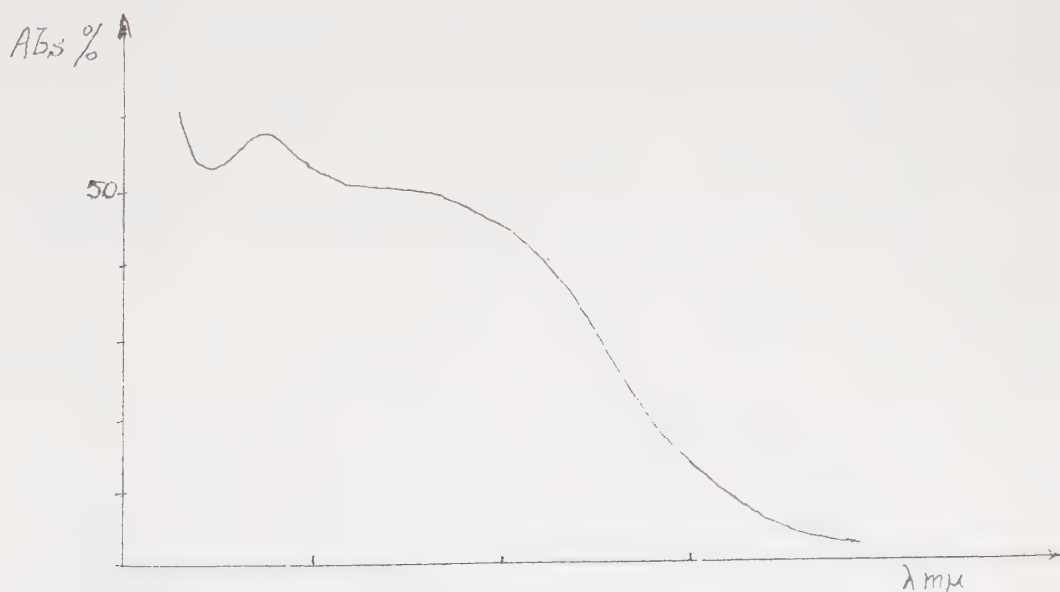


FIGURE N° 16 : Spectre UV-visible de la ferrédoxine obtenue après les trois étapes de purification.

Le milieu se compose de 0,3 mg de ferrédoxine en tampon TRIS HCl 0,1 M pH 7,3.

Le spectre s'apparente aux spectres obtenus pour les ferrédoxines des bactéries anaérobies (17).

Les cristaux sont de faible taille, mais se présentent sous forme d'agglomérats au microscope. Leur couleur est jaune-brun, la protéine étant à l'état oxydé.

L'image microscopique en contraste de phase apparaît selon le croquis suivant (Fig. 19).



FIGURE N° 19 : Image microscopique en contraste de phase $\lambda = 10 \times 30$.

Les bords des cristaux sont festonnés ; l'aspect général de la préparation est assez semblable aux clichés photographiques obtenus pour les ferrédoxines de Clostridium butylicum (16), Clostridium cylindrosporum (16) ou encore Methanobacillus omelianskii (17).

b) - Analyse des acides aminés1/ - Composition

L'analyse "TECHNICON" des acides aminés a donné les résultats résumés dans le tableau N° XII

TABLÉAU N° XII.

Ordre de passage sur la colonne	Nombre de résidus proposés pour les amino-acides de la ferrédoxine		
	Non cristallisée Rapport $\frac{DO-390}{280}=0,74$	Cristallisée	
		AMV-23 de protéine	Résidus
A. aspartique	7	0,96	6
Thréonine	1	0,28	2
Sérine	4-5	0,51	3
A. glutamique	5-6	1,26	7-8
Troline	2	0,52	2
Glycine	3	0,60	5
Alanine	8	1,11	7
Valine	6	0,91	5-6
Cystine	3-4	0,71	4
Méthionine	0	0,05	0
Isoleucine	4	0,67	4
Leucine	0	0,06	0
Tyrosine	0-1	0,18	1
Phénylalanine	1	0,21	1
Lysine	2	0,17	1
Histidine	0		0
Arginine	1	0,22	1
Tryptophane	0		0
Per dipyridyl	7 sur protéine telle quel		4 sur hydrolys.
M. calculée	5400 - 6000	5300	6600

La formule brute indiquée montre que de nombreux acides aminés sont absents du milieu ; les acides aminés principaux sont l'acide aspartique, l'acide glutamique, la glycine, l'alanine, l'isoleucine, la cystéine et la valine.

La masse moléculaire est recalculée en partant de la masse de chacun des résidus.

Les dosages de fer ont donné des résultats assez contradictoires. Ainsi, dans le cas d'un dosage direct sur la protéine non hydrolysée, nous obtenons la valeur de 7 atomes par molécule, alors qu'en faisant le dosage sur l'hydrolysate en milieu HCl, on n'obtient que 4 atomes de fer pour une masse moléculaire de 6000 pour la ferrédoxine. Il est possible qu'une dialyse des cristaux intervenant avant l'hydrolyse ait occasionné une perte en fer de la molécule par dénaturation du site actif et qu'ainsi des atomes de fer soient détachés.

Le fait que les acides aminés manquant en général dans les ferrédoxines ne se retrouvent pas dans la ferrédoxine de Clostridium acetobutylicum (par exemple le tryptophane) nous permet de penser que le produit obtenu est convenablement purifié.

2/ - Comparaison avec d'autres ferrédoxines
(cf tableau XIII)

Acides aminés par molécule	Methan. omel. (37)	Désulf. gigas (36)	Cl. butyr. (35)	Cl. past. (17)	Cl. acidu. (17)	Chromat. (17)	Cl. acétoab. (17)
Lysine	2	2	0	1	0	2	1
Histidine	0	0	0	0	0	2	0
Arginine	0	1	0	0	1	2	1
A. aspartique	3	11	9	8	8	9	6
Thréonine	1	0	3	1	1	6	2
Sérine	2	3	3	5	3	4	5
A. glutamique	5	10	5	4	4	16	7-8
Proline	2	4	3	3	4	5	2
Glycine	6	2	5	4	4	5	5
Alanine	14	6	7	8	9	4	7
Cystine	5	5	4	4	4	9	4
Valine	5	6	6	6	6	6	5-6
Méthionine	0	2	0	0	0	0	0
Isoleucine	0	6	4	5	5	7	4
Leucine	0	2	0	0	0	3	0
Tyrosine	2	0	0	1	1	3	1
Phénylalanine	0	1	2	1	0	0	1
Tryptophane	0	0	0	0	0	0	0
Per	-	4	-	7	-	-	4
résidus	47	61	51	51	50	33	49-51

TABLERAU N° XIII : Comparaison des compositions en acides aminés
des molécules de ferrédoxine ayant des ori-
gines différentes.

Comme Clostridium pasteurianum (17) et Clostridium butyricum (35), Clostridium acetobutylicum possède une ferrédoxine dont le nombre de résidus amino-acides est proche de la valeur 50. On remarque la présence d'un résidu lysine comme chez Clostridium pasteurianum. Nous y observons des corrélations très nettes sur le nombre des résidus, lysine, histidine, arginine, thréonine, sérine, glycine, alanine, cystine, valine, méthionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phénylalanine et tryptophane. Les plus grandes différences porteraient sur la répartition inverse des résidus aspartiques et glutamiques. En effet, on compte 6 molécules d'acide aspartique contre 6 et 9 chez les autres Clostridia. Par contre, la ferrédoxine de Clostridium acetobutylicum présenterait 7-8 résidus glutamiques au lieu de 4-5 pour les autres clostridia. Néanmoins; cette ferrédoxine apparaît très proche dans sa composition de celle des microorganismes du même genre et plus particulièrement des clostridia ayant une fermentation butyrique.

c) - Amélioration des purifications - Tableau N° XIV

TRAITEMENT (29)	CO 590/200	NOUVEAU TRAITEMENT	CO 590/200
WAL-cellulose		WAL-cellulose	
11	0,15	11	0,51
50-50 / 10 (11)	0,51	WAL-cellulose	0,69
		11	
55-75 / 10 (11)	0,69	WAL-cellulose	0,77
		11	

TABLEAU N° XIV : Comparaison des purifications de la ferrédoxine de Clostridium acetobutylicum par l'ancienne et la nouvelle technique.

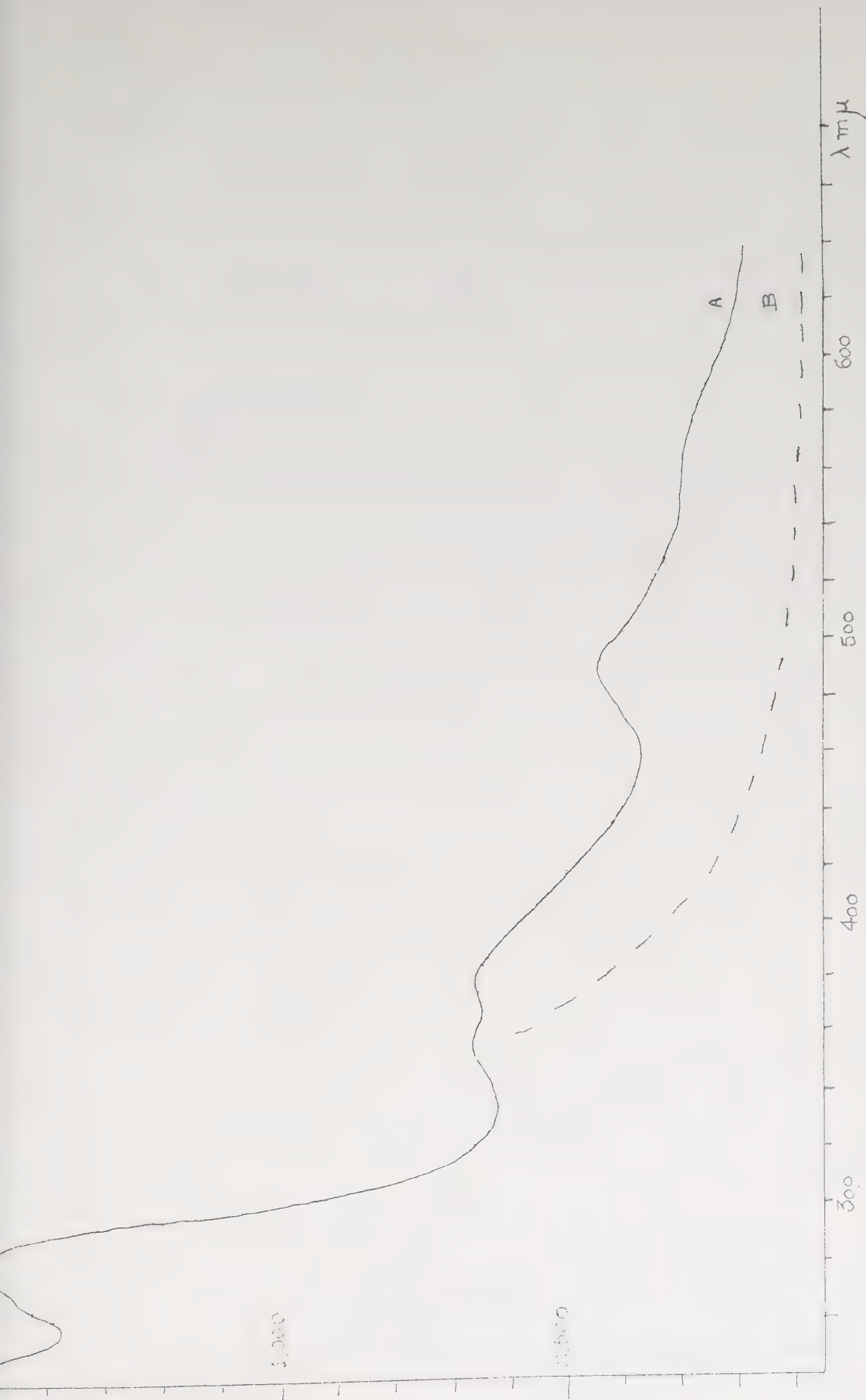


FIGURE n° 19 : Spectre UV-visible de la rubrédoxine de Clostridium acetobutylicum.

La cuve spectrophotométrique contient 1 ml de tampon TRIS HCl, 0,15 M, pH 7,3 et 1,4 mg environ de rubrédoxine ; la lettre A désigne le spectre à l'état oxydé, la lettre B, le spectre visible à l'état réduit.

Nous pensons qu'en évitant les traitements par le sulfate d'ammonium, la dénaturation de la protéine est moindre ; cela permet à la fois d'augmenter le rendement d'extraction du produit tout en améliorant la pureté spectrale.

D/ - Rubrédoxine

a) - Propriétés Spectrales - Réduction chimique (Fig. 19)

La réduction est obtenue en ajoutant deux gouttes d'une solution d'ions $S_2O_4^{--}$ à 0,5 mg/ml. Les ions réducteurs agissent selon la réaction :



La rubredoxine réduite est parfaitement incolore.

On constate très rapidement une autoxydation par l'air, mais une seconde addition de réducteur permet d'obtenir à nouveau le spectre réduit.

b) - Réduction de la rubrédoxine par l'hydrogène

L'activité hydrogénasique des extraits acellulaires de Clostridium acetobutylicum souche A303 824 a été contrôlée par WILKINSON (50).

1/ - Variations spectrales

Nous avons essayé de réduire la rubrédoxine par l'hydrogène dans les conditions suivantes :

- La réaction est effectuée en anaérobiose dans

les conditions précédemment décrites.

- Le diverticule D_1 contient 1 mg de protéines traitées sur DDAD-cellulose et 15 μ l phosphate pH 7,3. La cuve C_S contient 1,5 mg environ de rubrédoxine dans 100 μ l de tampon TRIS HCl pH 7,3.
- On vérifie l'apparition de la réaction de réduction en basculant la solution du diverticule D_1 dans C_S . La réaction est initiée par apport d'hydrogène au moyen du microbarboteur incorporé à la cuve. La solution blanchit très rapidement et en trois minutes la réaction est terminée, comme l'indiquent les figures N° 20 et 21.

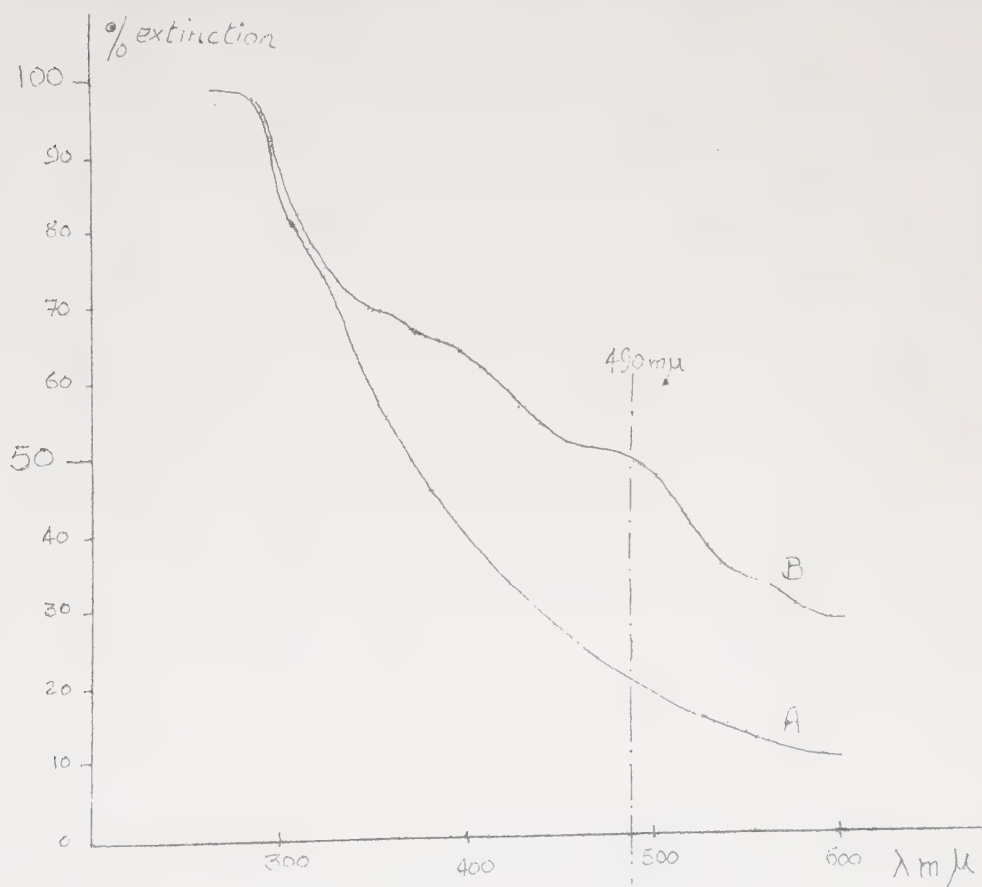


FIGURE N° 20 : Réduction de la rubrédoxine de Clostridium acetobutylicum au moyen d'extraits enzymatiques contenant de l'hydrogénase et de l'hydrogène.

- Sur la figure N° 20, le spectre UV-visible A est obtenu après le barbotage d'hydrogène. On constate la disparition des maxima d'absorption à 490 et 560 m μ , alors qu'un épaulement apparaît à 545 m μ (cf réduction par hydrogénase de la rubrédoxine de Clostridium pasteurianum (4)). Les protéines de l'extrait acellulaire en grande quantité masquent le spectre.
- Le spectre B a été obtenu par réoxydation du milieu réactionnel par l'oxygène atmosphérique. Le pic à 490 m μ reparait sous forme d'un épaulement très net.

2/ - Activité spécifique des extraits en atmosphère saturée d'hydrogène (Fig. 21)

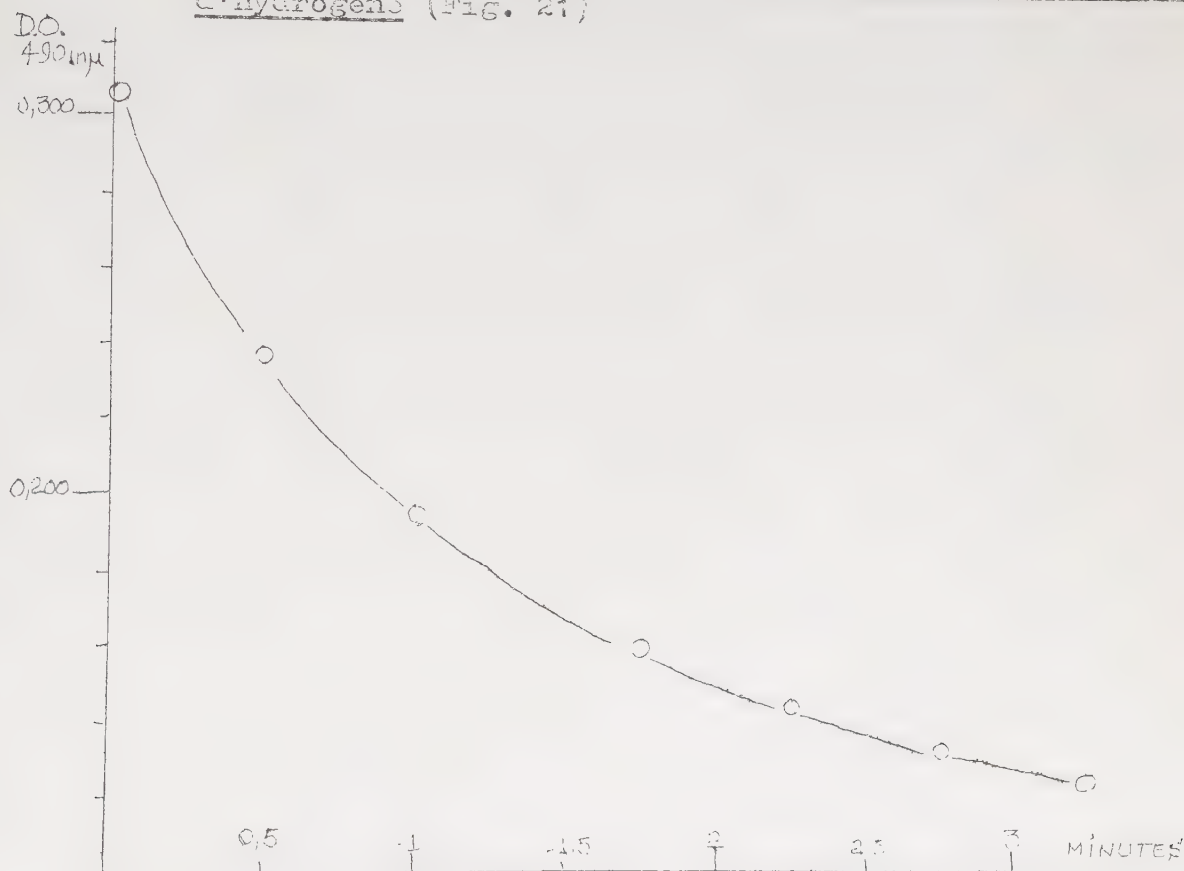


FIGURE N° 21 : Cinétique en atmosphère saturée d'hydrogène.

- La cuve C_S contient 1 mg de rubrédoxine dans 100 μ l de TRIS HCl 0,1 M pH 7,3. Le diverticule D_1 comporte 4 mg d'extrait protéique + 0,15 μ l phosphate de potassium pH 7,3. Les contenus de D_1 et C_S sont saturés en hydrogène. La réaction est provoquée en versant le contenu de D_1 dans C_S . La densité optique est lue à 490 m μ . La réduction est pratiquement totale au bout de 5 minutes. L'activité spécifique des extraits est de 27,5 U "hydrogénase".

c) - Mise en évidence de la rubrédoxine NAD-oxydo-réductase

1/ - Variations de spectre UV-visible

Nous avons entrepris des essais de réduction de la rubrédoxine par le coenzyme réduit $NADH, H^+$. Il s'agissait de savoir si Clostridium acetobutylicum possède une rubrédoxine NAD^+ -oxydo-réductase ayant des propriétés comparables à celles de Clostridium sticklandii (5) et de Desulfovibrio gigas (24). En une première étape, nous avons contrôlé les variations spectrales de la rubrédoxine en présence de NADH et d'extrait acellulaire. Voir Figure N° 22.

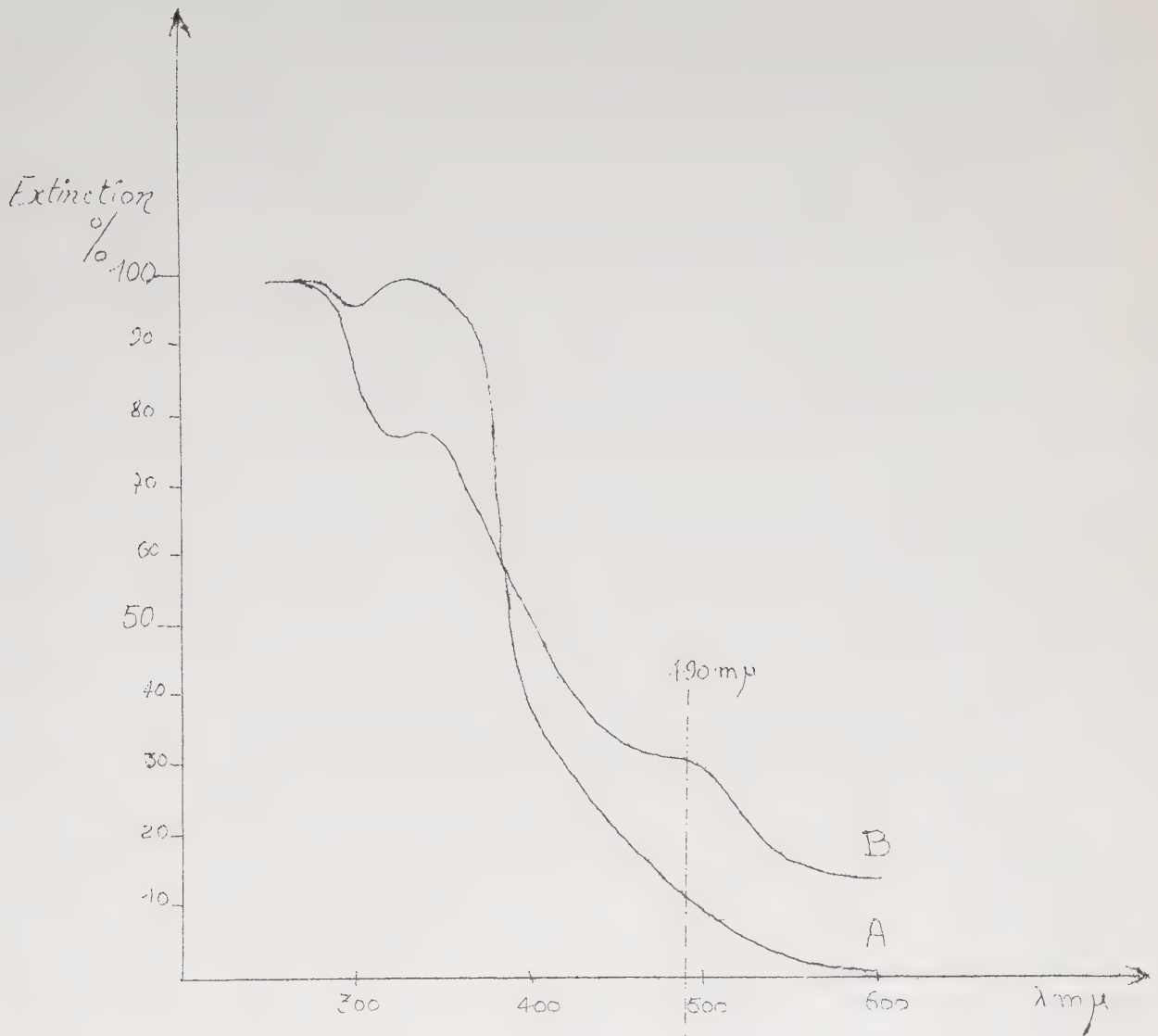


FIGURE N° 22 : Réduction de la rubrédoxine en présence de H₂O₂ et de l'extract cellulaire.

La cuve C₀ de 1 ml contient 1 μ g environ de rubrédoxine et 100 μ l. TRIS 101 pH 7,5. Le diverticule A₁ contient 2 μ g de protéines traitées sur NCAS-cellulose et 15 dans 15 μ l de tampon phosphate-potassium pH 7,5. Le diverticule C₂ contient 0,5 μ l. H₂O₂ dans 10 μ l. TRIS 101, pH 7,5.

Les conditions d'anaérobiose sont réalisées, les dernières traces d'oxygène et d'hydrogène étant retirées sous vide, l'ensemble est maintenu sous atmosphère d'argon.

Les protéines contenues dans D_1 sont versées dans C_3 .

Il ne se passe rien et la réduction commence lorsqu'on verse la solution de NADH dans C_3 .

L'étude du spectre A obtenu après ce traitement permet de constater l'absence de pic à 490 m μ ; la partie proche de l'ultraviolet absorbe très fortement car nous avons apporté un excès de NADH dont l'absorption caractéristique est à 340 m μ . Pour vérifier si le spectre A correspond à la réduction de la rubrédoxine, nous avons réoxydé totalement le milieu en présence d'air et tracé le spectre B. On constate alors une remontée de la densité optique à 490 m μ et l'apparition d'un épaulement à cette longueur d'onde, alors que le pic à 340 m μ a considérablement diminué. Cette variation de densité optique à 490 m μ indique une consommation de NADH en présence d'oxygène, certainement due à l'activité NADH-oxydase de nos extraits (39)(40).

2/ - Etude cinétique

- Activation de la réaction

Ces essais ont été repris afin de chiffrer l'activité enzymatique des extraits.

La figure N° 23 donne les variations de densité optique à 490 m μ en fonction du temps.

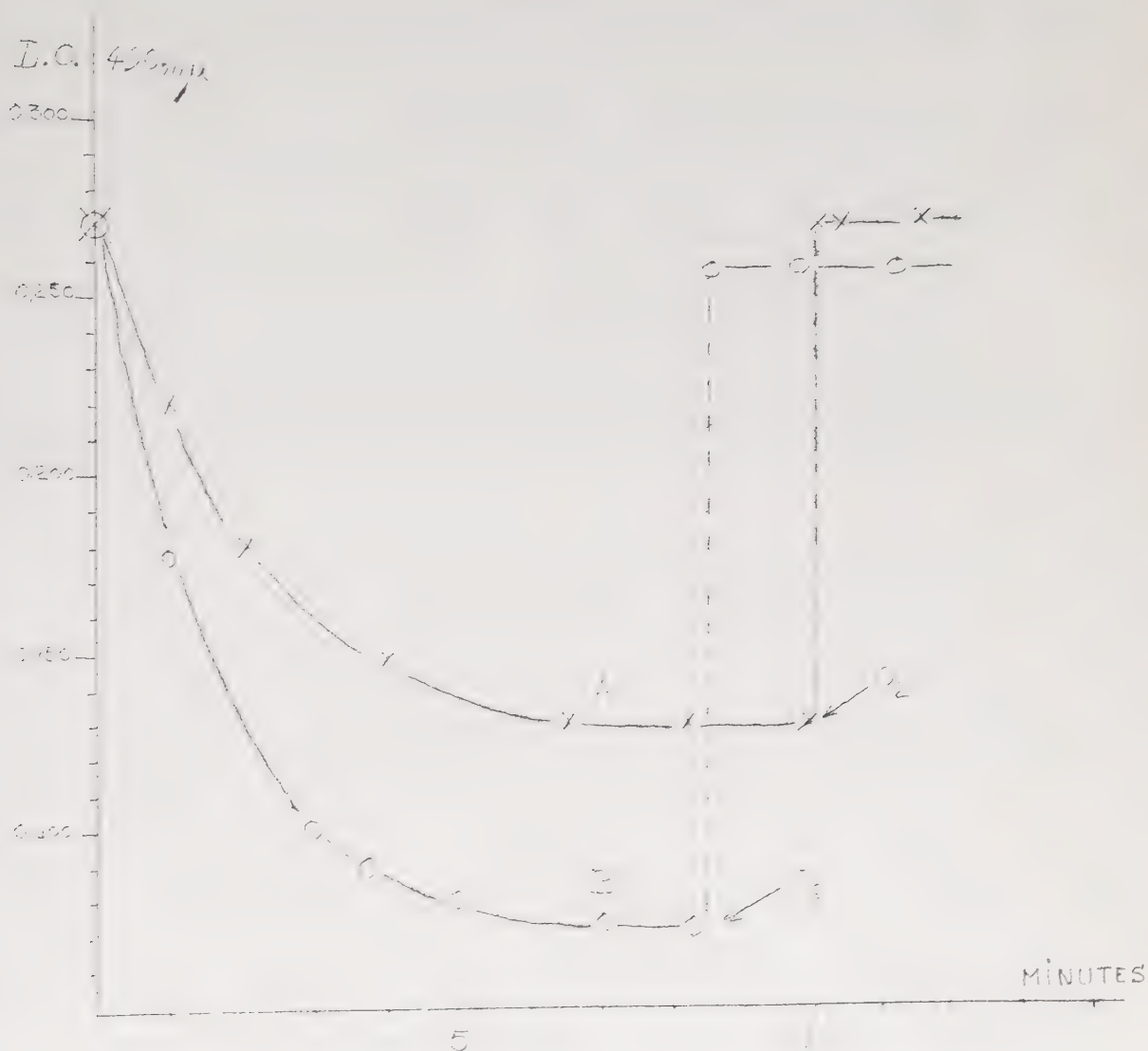


FIGURE N° 23 : Courbes de cinétique de réduction de la
substance par l'Al. Courbe A sans FAD
Courbe B avec FAD

Les conditions de la réaction sont :

$C_S = 1$ mg de rubrédoxine + 100 μ l TRIS HCl, pH 7,3.

$D_1 = 0,2$ mg d'extrait acellulaire traité sur DEAE-cellulose DE 11 dans une solution de 15 μ l de phosphate pH 7,3.

$D_2 = 0,2$ μ l NADH dans 10 μ l de TRIS-HCl, pH 7,3.

Courbe B = Mêmes conditions que précédemment, mais on ajoute en plus 50 μ l de FAD dans D_1 .

La réaction est mise en route par un apport de NADH sous gaz inerte.

- FAD absorbant légèrement dans la région 490 m μ , nous avons déplacé les ordonnées, afin d'avoir le même point de départ pour les courbes.

On constate que la réduction de la rubrédoxine est plus rapide en présence de FAD (courbe B) ; sans FAD, la réduction ne semble pas être complète au bout de 9 minutes. L'activité spécifique pour la courbe A est de 16 U/mg contre 28 U/mg pour la courbe B. FAD semble donc avoir un rôle activateur vis-à-vis de la réduction de la rubrédoxine par NADH.

Pour la suite de nos expériences, nous avons choisi d'ajouter systématiquement FAD à l'extrait acellulaire. En effet, lors des séparations sur DEAE-cellulose, l'extrait perd FAD qui apparaît sous forme d'un anneau jaune élué en TRIS-HCl 0,15 M pH 7,3 ; par ailleurs, nous savons que la réductase intervenant au niveau de la rubrédoxine, est probablement une flavoprotéine. Enfin, il a été montré que FAD active la rubrédoxine NAD-réductase de Pseudomonas oleovorans (27).

- Cinétique selon LINDEMEYER-BURK (Fig. 24)

Des concentrations variables en NADH ont été appliquées sur les extraits acellulaires traités par la DME-cellulose. La rubrédoxine est maintenue à un taux constant de 1,4 mg dans chaque expérience. La constante K_m a été calculée à 25° C. pour des extraits acellulaires titrant 4,8 mg de protéine dans 15 μ l de phosphate potassique. Les concentrations sont rectifiées en fonction du volume contenu dans C_3 en fin d'expérience. Les quantités de NADH contenues successivement dans D_2 sont : 0,4 mg ; 0,3 mg ; 0,2 mg ; 0,1 mg. La constante K_m calculée dans ces conditions est égale à $1,0 \cdot 10^{-3}$ l/litre à 25° C.

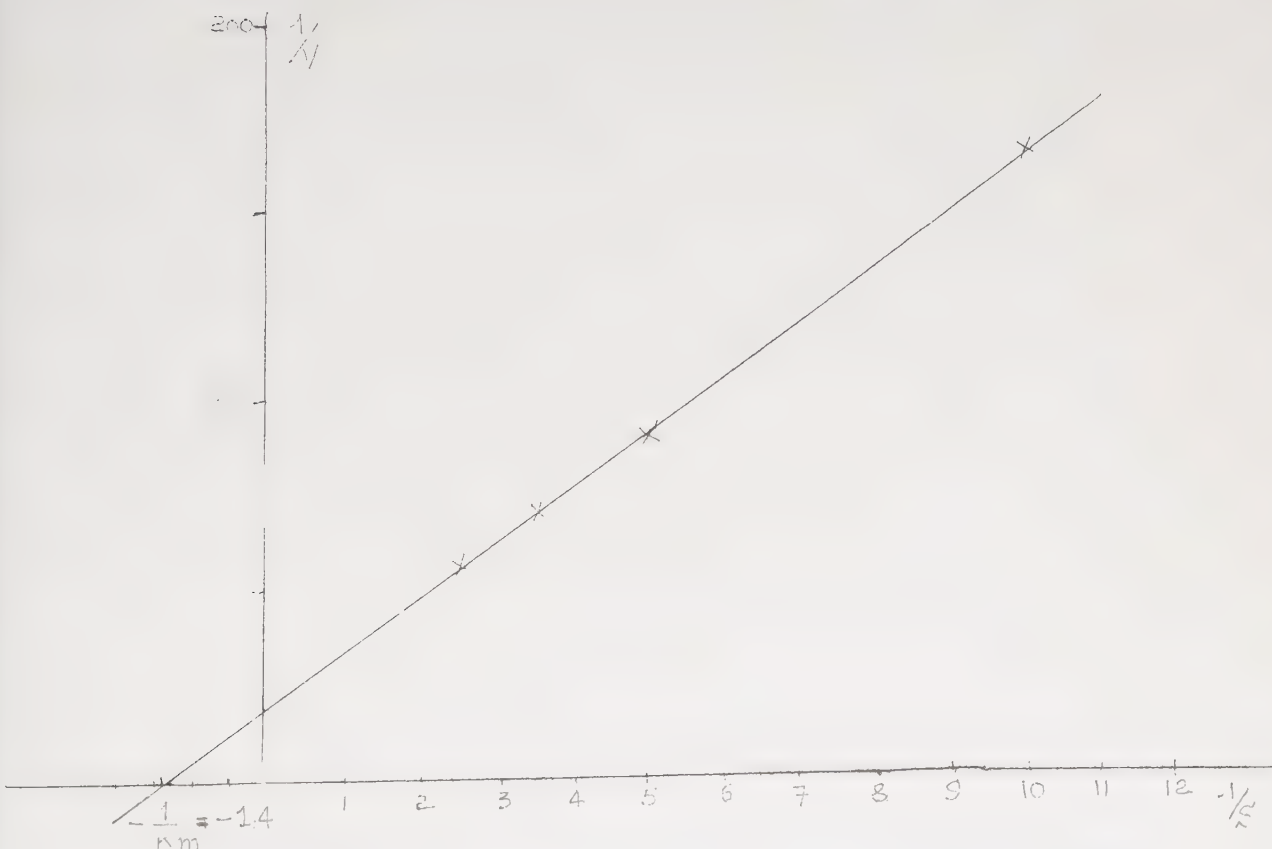


FIGURE N° 24 : Représentation de LINDEMEYER-BURK

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{\Delta CC \times t \cdot 10^{-1}} \quad ; \quad \frac{1}{S} = \frac{1}{15 \text{ NADH} \times 10^{-1}}$$

3/ - Réactivité vis-à-vis de NADPH

Cinétique enzymatique

En substituant NADPH à NADH pour réduire la rubrédoxine, nous avons constaté que la réaction se faisait ; mais au lieu de commencer dès qu'on introduit le substrat NADPH, la réaction ne commence qu'après un temps de latence. La figure N° 25 résume les résultats obtenus en cinétique avec NADPH.

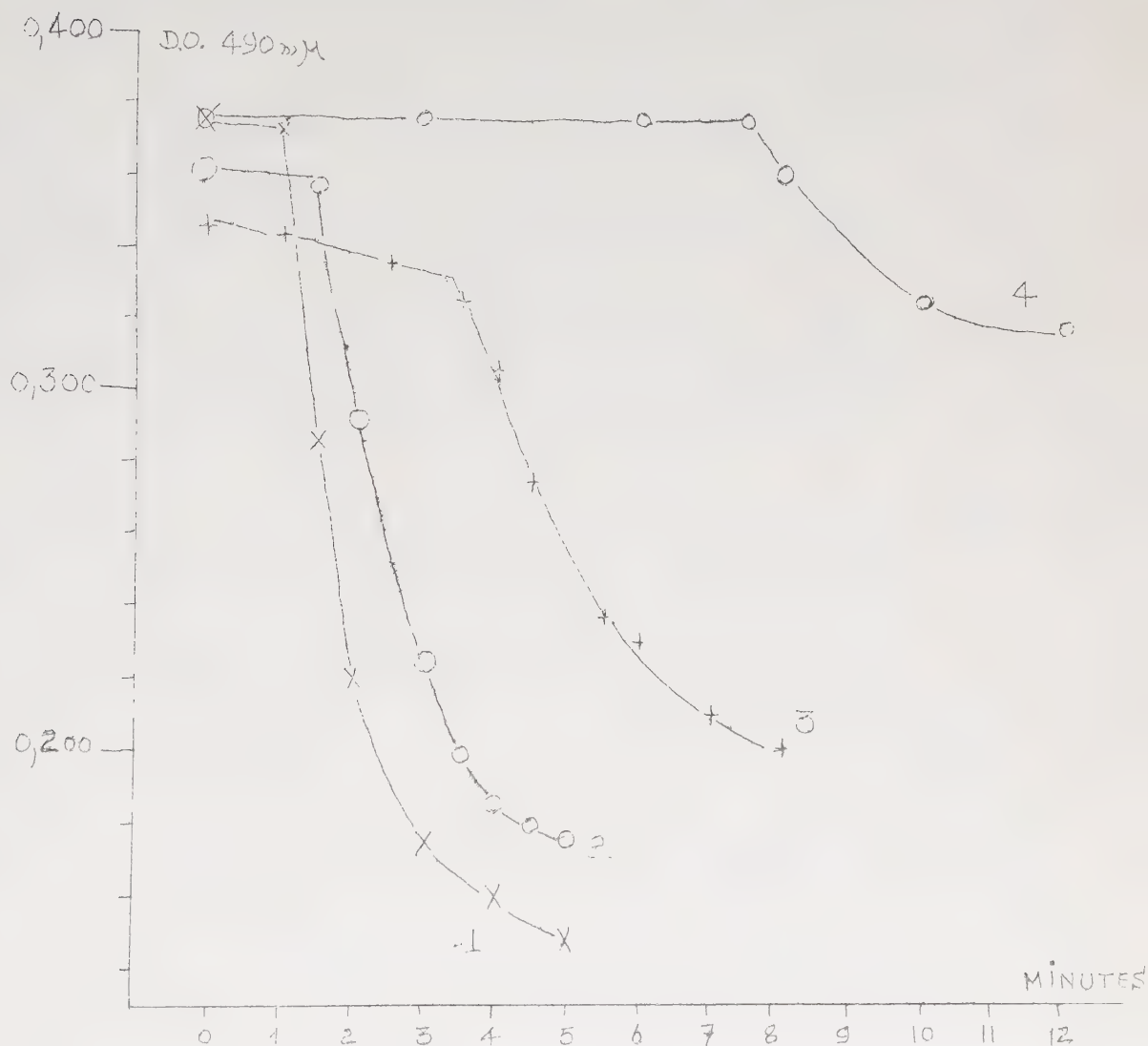


FIGURE N° 25 : Cinétique de réduction de la rubrédoxine avec des concentrations décroissantes de NADPH.

Les conditions de réaction sont les suivantes :

$C_3 = 1,4$ mg de lubrédoxine environ, $100 \mu\text{l}$ de TRIS HCl
pH 7,3

$C_1 = 4,5$ mg de protéine provenant de l'extrait acellu-
laire filtré sur DEAE-cellulose DE 11, $0,15 \mu\text{l}$ de
phosphate de potassium pH 7,3, $50 \mu\text{g}$ de PMS.

$C_2 =$ contient successivement pour les essais :

1 = $0,4$ mg NADPH, $10 \mu\text{l}$ de TRIS HCl pH 7,3

2 = $0,2$ mg NADPH, $10 \mu\text{l}$ de TRIS HCl pH 7,3

3 = $0,1$ mg NADPH, $10 \mu\text{l}$ de TRIS HCl pH 7,3

4 = $0,05$ mg NADPH, $10 \mu\text{l}$ de TRIS HCl pH 7,3

Au temps = 0, le contenu de C_2 est versé dans C_3 et
mélangés.

On constate que les pentes des courbes 1,2,3,4
diminuent en valeur absolue respectivement en fonction
des concentrations décroissantes de NADPH.

Des résultats de ces expériences, nous avons rete-
nu les deux renseignements suivants α et β .

α - Cinétique DEHAARDEN-BURK

On sait que pour le substrat NAD^+ , nous avons
essayé de calculer la constante de Michaelis K_m que
nous avons trouvée égale à $1,4 \cdot 10^{-5}$ /litre à 25°C ,
dans les conditions décrites ci-dessus.

La figure 1^{re} résume ce calcul.

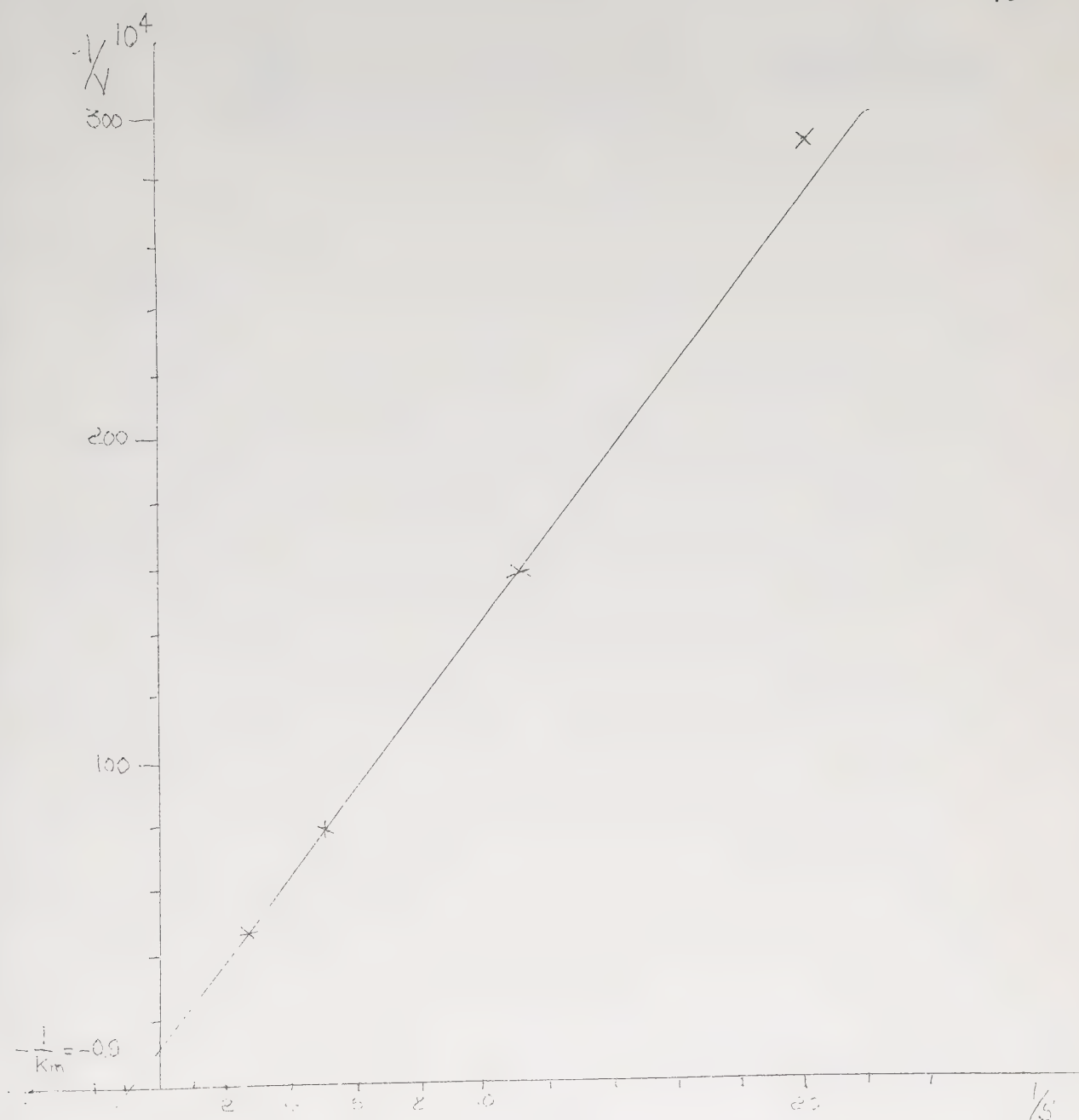


FIGURE N° 25 : Représentation de LINEWEAVER-BURK, cinétique de réduction de la rubrédoxine par NADPH en présence d'extraits cellulaires traités sur DEAE-cellulose de Clostridium acetobutylicum.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{\Delta \text{ c } \times \text{ m }^{-1}} \quad ; \quad \frac{1}{S} = \frac{1}{\text{g NADPH} \times \text{ ml }^{-1}} \quad ;$$

β - Variation du temps de latence en fonction de la concentration en substrat (Fig. 27)

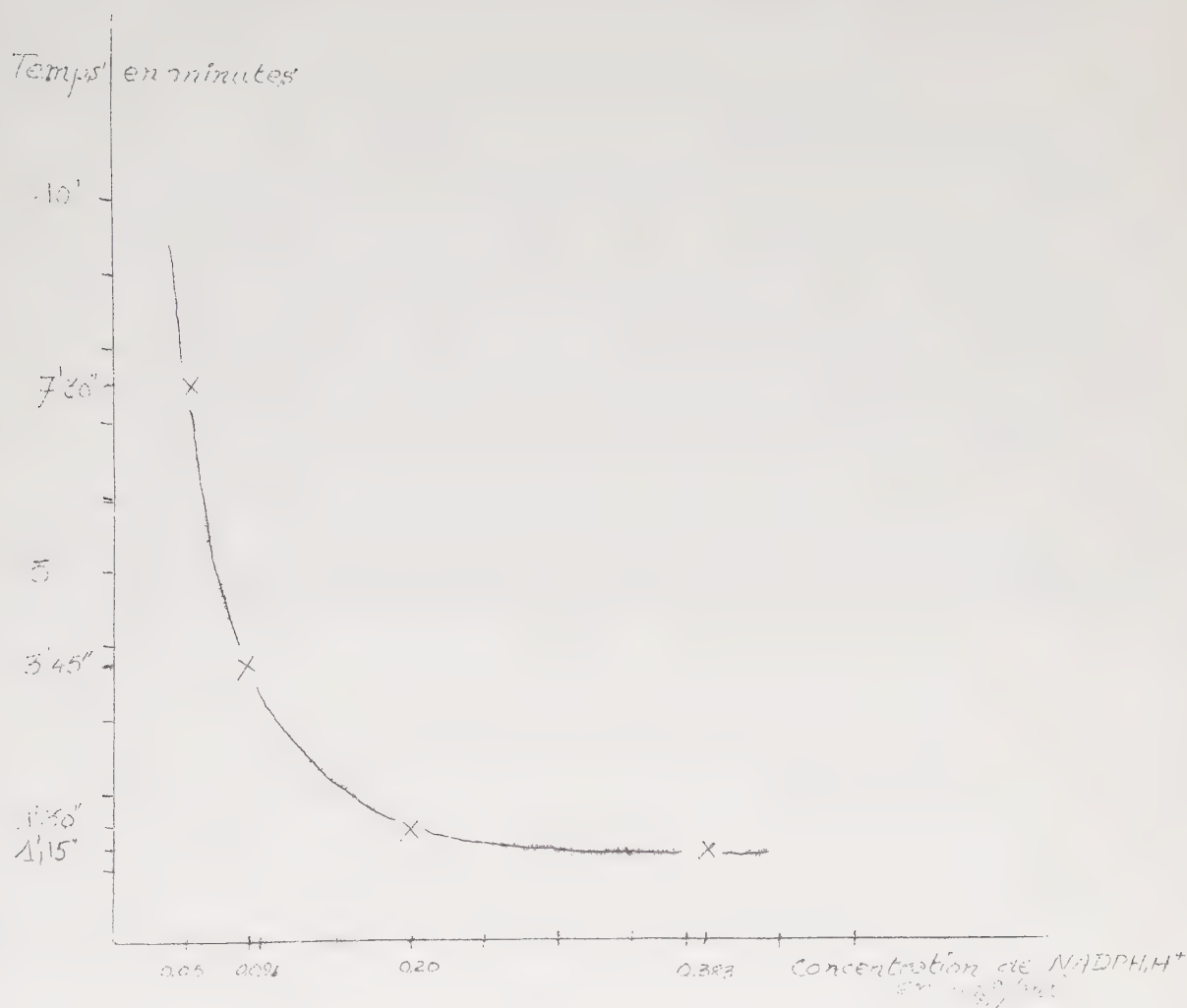


FIGURE N° 27 : Variation du temps de latence de la réduction de la rubrédoxine en fonction de la concentration en NADPH.

En examinant la courbe (fig. 27), nous constatons que le temps de latence augmente très rapidement lorsque les concentrations en NADPH diminuent. Ceci incite à penser qu'une partie du substrat est utilisée pour réduire un système enzymatique et que la réaction ne peut commencer qu'au moment où ce système est entièrement réduit.

A l'opposé, lorsqu'on accroît les concentrations de NADPH, le temps de latence se stabilise à environ 1 minute. Cela indique que la réaction de réduction de ce système enzymatique est soit limitée par la cinétique propre au système, soit encore limitée par une carence en coenzyme. Nous avons retenu la seconde hypothèse en vérifiant que le système fonctionnant avec NADPH présente un temps de latence plus court lorsqu'on ajoute NAD^+ . (4/, fig. 28).

4/ - Activité "transhydrogénasique apparente" des extraits acellulaires vis-à-vis de la réduction de la rubrédoxine par NADPH

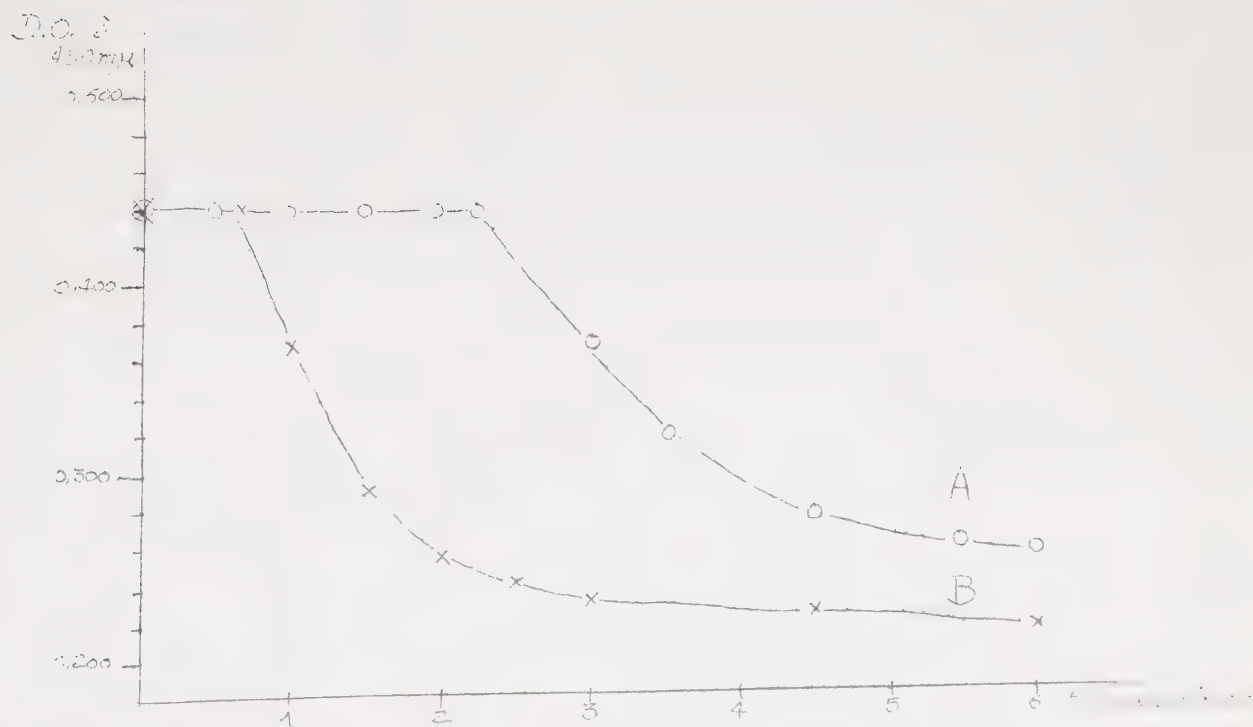


FIGURE N° 28 : Courbe A = NADPH seul, comme substrat
Courbe B = NADPH + NAD^+

L'essai représenté sur la figure N° 20 est réalisé dans les conditions suivantes :

$C_0 = 1,2 \text{ ng}$ rubrédoxine, $100 \text{ } \mu\text{l}$ de TRIS HCl pH 7,3

$D_1 = 4,5 \text{ ng}$ extrait enzymatique, $15 \text{ } \mu\text{l}$ de phosphate-K, pH 7,3

$D_2 = \frac{\text{Courbe A}}{\text{pH 7,3}} = 0,2 \text{ } \mu\text{l}$ de NADPH, H^+ , $10 \text{ } \mu\text{l}$ de TRIS HCl, pH 7,3

$\frac{\text{Courbe B}}{\text{pH 7,3}} = 0,1 \text{ } \mu\text{l}$ de NADPH, H^+ , $10 \text{ } \mu\text{l}$ de TRIS HCl, pH 7,3 + $0,1 \text{ } \mu\text{l}$ de NAD^+ .

On constate à l'examen des courbes A et B que le temps de latence est réduit si l'on apporte NAD^+ à l'extrait acellulaire en même temps que NADPH. Il semble donc que la réduction de la rubrédoxine par NADPH soit tributaire d'une réaction secondaire, nécessitant la réduction préalable de NAD^+ . La rubrédoxine NAD^+ -oxydo-réductase serait alors très spécifique vis-à-vis du coenzyme NAD^+ . Le transfert des électrons de NADPH sur NAD^+ pourrait être fait par une transhydrogénase.

La comparaison des activités spécifiques : courbe A = $24,4 \text{ U} \times \text{mn}^{-1} \times \text{ng}^{-1}$ - courbe B = $55 \text{ U} \times \text{mn}^{-1} \times \text{ng}^{-1}$, est en faveur de cette hypothèse car l'activité réductrice paraît stimulée par l'apport de NAD^+ .

Les extraits acellulaires perdent par lavage et par filtration sur DEAE-cellulose, une partie du coenzyme NAD^+ ; néanmoins, il en reste suffisamment pour accepter des électrons de NADPH lorsqu'on n'ajoute pas NAD^+ .

Nous n'avons pas vérifié si le temps de latence de la réaction augmente en retirant tout le NAD^+ de l'extrait

acellulaire en le filtrant par exemple sur charbon actif. Ce point sera éclairci lors de la discussion.

c) - Comparaison des cinétiques obtenues avec NADH et NADPH comme substrats

Les valeurs des constantes de Michaëlis obtenues $K_m \text{ NADH} = 1 \times 10^{-3} \text{ M/litre}$ et $K_m \text{ NADPH} = 1,4 \times 10^{-3} \text{ M/litre}$ sont assez proches l'une de l'autre. On peut considérer que compte tenu des erreurs possibles dans les manipulations, elles sont d'un même ordre de grandeur. Pourtant, la valeur calculée pour NADPH étant supérieure à celle obtenue pour NADH, on peut penser dans l'éventualité d'une activité transhydrogénasique que NADH, H^+ obtenu enzymatiquement présente plus de réactivité vis-à-vis de la rubrédoxine NAD^+ -oxydo-réductase que NADH, H^+ réduit chimiquement. Ce phénomène est souvent constaté dans les essais enzymatiques utilisant des coenzymes réduits. La comparaison des activités spécifiques avec substrats NADH et NADPH ne permettrait pas de conclure car nos essais ont été faits avec des extraits acellulaires préparés de façon analogue mais présentant cependant dans chaque cas des variations expérimentales susceptibles de masquer les enseignements que nous pourrions en tirer ; les réactivités avec NADH et NADPH sont proches l'une de l'autre.

En conclusion, les extraits acellulaires de Clostridium acetobutylicum possèdent une rubrédoxine oxydo-réductase certainement spécifique du coenzyme NAD^+ , dont la constante de Michaëlis $K_m = 10^{-3} \text{ M/litre}$ à 45° C. en tampon CaCl_2 0,1, pH 7,5, 0,1 M et en présence de phosphate minéral.

e) - Réduction par la réaction de décarboxylation oxydative du pyruvate de sodium

La réduction de la rubrédoxine en présence de pyruvate de sodium a été faite en comparaison avec la ferrédoxine.

La composition du milieu dans les tubes de THUNBERG est la suivante (cf tableau N° XV)

	TUBE I	TUBE II	TUBE III
Diverticule	50 µl H ₂ FAD 150 µl pyruvate	50 µl H ₂ FAD 150 µl pyruvate	50 µl H ₂ FAD 150 µl pyruvate
Cuve	90 µl phosphate de H	90 µl phosphate de H	90 µl phosphate de H
	100 µl HSCoA à 0,5 mg/ml	100 µl HSCoA à 0,5 mg/ml	100 µl HSCoA à 0,5 mg/ml
	Extrait enzymatique traité sur DEAE cellulose 9 mg	Extrait enzymatique traité sur DEAE cellulose 9 mg	Extrait enzymatique traité sur DEAE cellulose 9 mg
	Blanc	Ferrédoxine ⁺ 0,1 mg	Rubrédoxine ⁺ 0,1 mg
Dosage de l'acétylphosphate formé	0,004 µl	7,5 µl	1,75 µl
	0,005 µl	10 µl	2,3 µl

TABLEAU N° XV - Activité réductrice comparée du pyruvate vis-à-vis de la ferrédoxine et de la rubrédoxine (2 essais).

La décarboxylation oxydative du pyruvate conduit à la formation d'acétyl-phosphate qui en présence d'hydroxylamine forme de l'acide hydroxamique. L'acide hydroxamique avec les ions Fe^{3+} donne une réaction colorée dont on peut doser l'intensité par la méthode de LIPMAN et TULLO (40). Dans les conditions de réaction utilisées dans cette méthode (34) 1 μ d'acétyl-phosphate donne une élévation de 0,170 de la densité optique lue à 540 m μ .

En consultant les résultats du tableau N° XV, on peut voir que pour chaque expérience la quantité d'acétyl-phosphate obtenue avec la rubrédoxine est environ 4 à 5 fois plus faible que celle obtenue avec la ferrédoxine. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par LOVEMBERG et Coll. (4) pour la rubrédoxine de Clostridium pasteurianum.

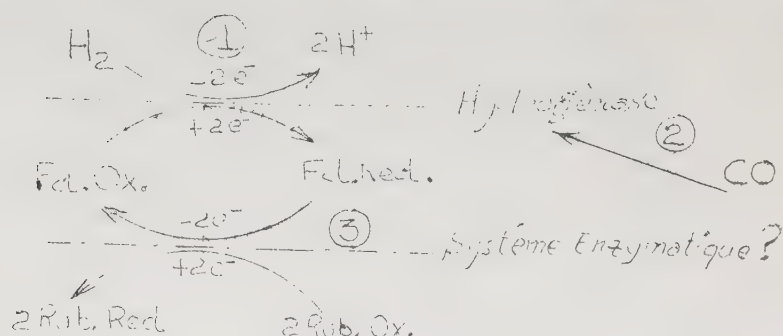
2) - Eventualité d'un transfert d'électrons entre ferrédoxine et rubrédoxine

1/ - Variations spectrales

La composition du milieu de la réaction est la suivante :

- C_{10} = Ferrédoxine 4 mg, 00 μ l. de TMSO 0.01, pH 7,5
- $\uparrow$ = Extrait enzymatique non lavé ais filtré sur
MIL cellulosic 1,4 mg, 10 μ l. de phosphate de K
pH 7,5
- C_{11} = 1 mg de rubrédoxine, 10 μ l. de TMSO 0.01, pH 7,5

La réaction est effectuée d'après le principe suivant :



- 1 - Réduction de la ferrédoxine par l'hydrogène et l'hydrogénase.
- 2 - Inhibition de l'hydrogénase par l'oxyde de carbone. En effet, si l'hydrogénase n'est pas inhibée, elle risque de réduire la rubrédoxine.
- 3 - Essai de réduction de la rubrédoxine en présence de ferrédoxine réduite.

En pratique, la manipulation est effectuée ainsi :
(cf Fig. 29)

- 1 - Le contenu de D_1 est versé dans C_5 (spectre 1) et l'ensemble est soumis à un barbotage d'hydrogène. On constate que la solution vire de la couleur brune à la couleur jaune pâle (spectre 4).
- 2 - L'ensemble est dégazé sous vide et le vide est cassé sous oxyde de carbone. Les solutions dans C_5 et D_2 subissent un barbotage d'oxyde de carbone.
- 3 - D_2 est basculé dans C_5 toujours sous oxyde de carbone et après 10 minutes à $45^\circ C.$; le spectre 1 est tracé.

4 - L'ensemble est totalement réoxydé à l'air libre, le spectre 4 est alors tracé.

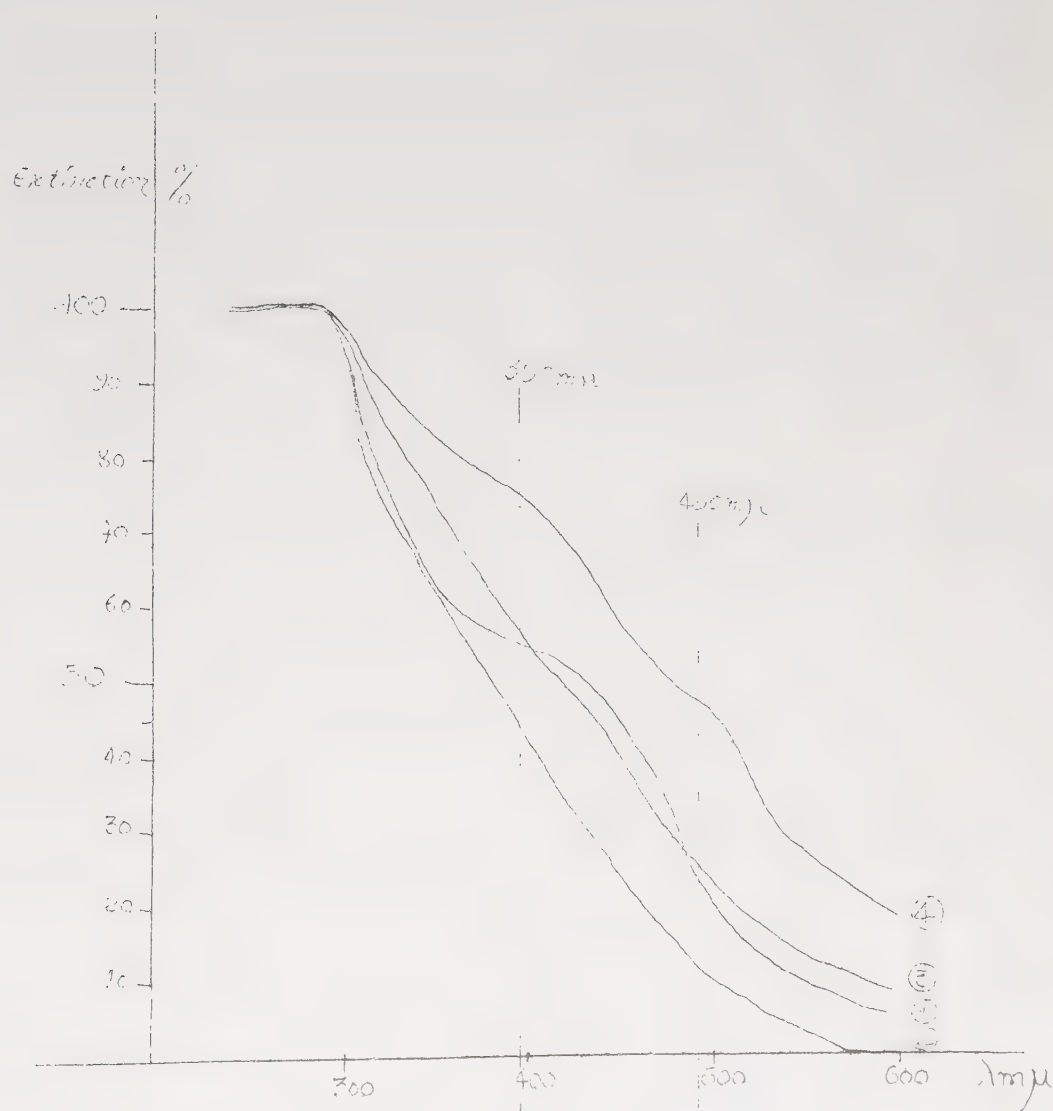


FIGURE N° 29 : Variations spectrales du mélange ferrédoxine réduite-rubrédoxine oxydée en présence d'extraits acellulaires.

Le spectre 1, figure 29, présente un épaulement à 390 m μ typique de la ferrédoxine oxydée ; le spectre 2 indique que la ferrédoxine a été réduite par l'hydrogénase du fait du traitement à l'hydrogène qui a provoqué la disparition de l'épaulement à 390 m μ . Le spectre 3 présente une augmentation globale d'absorption due à l'apport protéique, mais a plutôt une apparence réduite, ce qui incite à penser que la rubrédoxine versée dans le milieu s'est réduite. En effet, l'observation visuelle de la solution indique que la solution demeure faiblement colorée en versant la rubrédoxine. On constate seulement une accentuation de la teinte jaune pâle. Le spectre 4 obtenu après réoxydation totale montre deux épaulements caractéristiques à 490 et 390 m μ qui indiquent que la rubrédoxine et la ferrédoxine se sont oxydées par rapport à leur état dans le spectre 3.

Nous avons voulu voir s'il était possible de chiffrer cette activité de réduction de la rubrédoxine. C'est l'objet de l'essai suivant.

2/ - Etude cinétique

L'essai précédent a été renouvelé en apportant toutefois des modifications :

Milieu réactionnel :

C₃ = Ferrédoxine, 2 mg, 80 μ l de TRIS HCl, pH 7,3
 5,1 mg d'extract acellulaire lavé et filtré sur
 100 cellulose, 15 μ l de phosphate de potassium
 pH 7,3, 50 μ l de PMS.

C₁ = 1 mg de rubrédoxine 30 μ l de TRIS HCl, pH 7,3

C₂ = 0,2 μ l H₂S⁺, 5 μ l de TRIS HCl, pH 7,3.

La même expérience est faite en absence de ferrédoxine.

La ferrédoxine est réduite au préalable et tout l'ensemble est traité à l'oxyde de carbone avant que D_1 soit versé dans C_5 . A ce moment la densité optique est lue à 490 $m\mu$ (cf figure N° 50).

On constate que rien ne se produit en apparence pendant 12 minutes. Donc il semble que le passage des électrons de la ferrédoxine réduite à la rubrédoxine oxydée ne se fasse pas. Comme nous avons lavé les cellules, nous avons pensé à ajouter NAD^+ qui manque certainement dans le milieu. En fait, l'apport de NAD^+ permet de constater que la densité optique à 490 $m\mu$ diminue, donc que la rubrédoxine se réduit comme nous avons pu le vérifier en réoxydant le milieu après l'expérience.

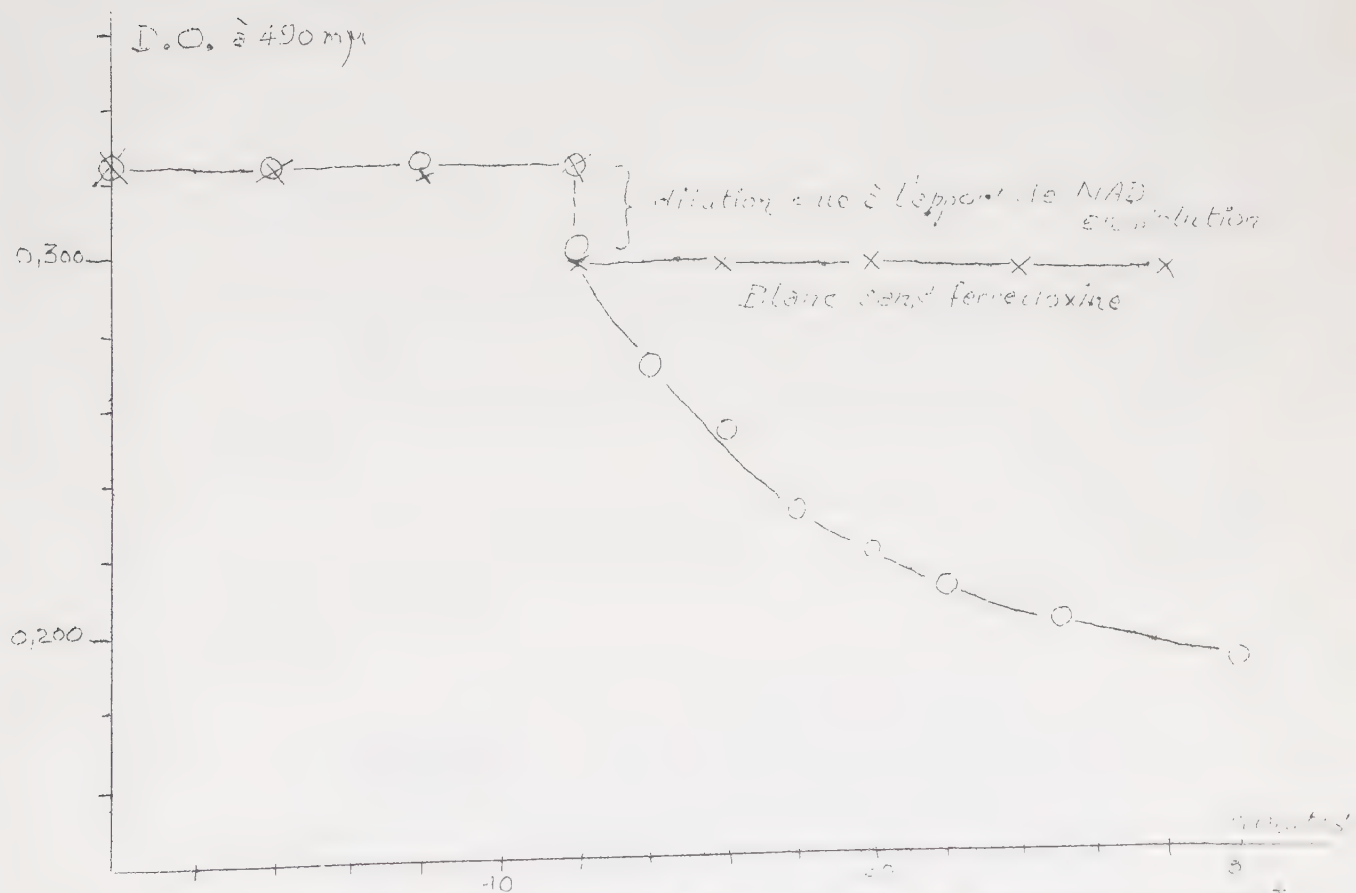


FIGURE N° 50 : Réduction de la rubrédoxine en présence de NAD^+ et de ferrédoxine réduite.

L'activité spécifique est faible : $6 \text{ U réductase} \times \text{mg}^{-1} \times \text{mn}^{-1}$. Néanmoins, la réaction semble se produire alors que le blanc sans ferrédoxine est stable en apparence. La faible activité peut s'expliquer par le fait que l'atmosphère d'oxyde de carbone n'est pas particulièrement favorable à l'activation des extraits, aussi parce que la réactivité de la ferrédoxine vis-à-vis de la réduction de NAD^+ est faible (41)(42), et enfin parce que la rubrédoxine a des propriétés anti-oxydantes assez remarquables (cf paragraphe suivant). Cette expérience montre que deux enzymes différentes interviennent, l'une pour l'oxydation de la ferrédoxine, l'autre pour la réduction de la rubrédoxine, sinon NAD^+ ne serait pas nécessaire.

g) - Réduction du cytochrome C de mammifère

La rubrédoxine présente une grande réactivité vis-à-vis du cytochrome C, de telle sorte que l'on peut utiliser ce cytochrome comme traceur de la réduction de la rubrédoxine (24). Nous avons voulu voir si les extraits acellulaires de Clostridium acetobutylicum permettaient l'utilisation du cytochrome C dans ces conditions, afin d'économiser éventuellement les quantités importantes de rubrédoxine nécessaires pour faire une cinétique à 490 m μ .

Les réactions sont faites en anaérobiose et les conditions d'obtention des couples de spectres d'absorption en lumière visible : 1 ; 2 ; 3 sont les suivantes pour la figure 31.

1 = C_S contient 3,4 mg d'extrait acellulaire traité sur DEAE-cellulose DE 11 et 0,5 mg de cytochrome C de foie de cheval dans 100 μl de TRIS HCl , pH 7,3. La réduction est provoquée par barbotage d'hydrogène.

2 = C₃ contient la même chose qu'en 1, plus 1 mg de rubédoxine. La réduction est initiée par basculage de D₁.

3 = C₃ contient les mêmes produits qu'en 1, mais avec 0,5 mg de ferrédoxine.

La réduction est obtenue par barbotage d'hydrogène ; le spectre 1 indique que le cytochrome C a été réduit par les extraits acellulaires en présence d'hydrogène.

Le spectre 1' correspond au milieu réactionnel après réoxydation à l'air = le cytochrome C est de nouveau oxydé.

Les spectres 2 et 3 donnent les mêmes résultats que le spectre 1.

Mais 2' et 3' obtenus après réoxydation violente à l'oxygène pur ne montrent pas de réoxydation du cytochrome C ; on constate seulement une diminution des pics à 550 mμ après 12 heures, soit quand les produits ont de fortes chances d'être dénaturés.

L'aspect de l'absorption dans la région 500-640 mμ indique que les protéines à fer-non-hémique se sont réoxydées. Il semble donc que les extraits en présence de ferrédoxine et de rubrédoxine aient un rôle protecteur vis-à-vis de l'oxydation du cytochrome C de camifères.

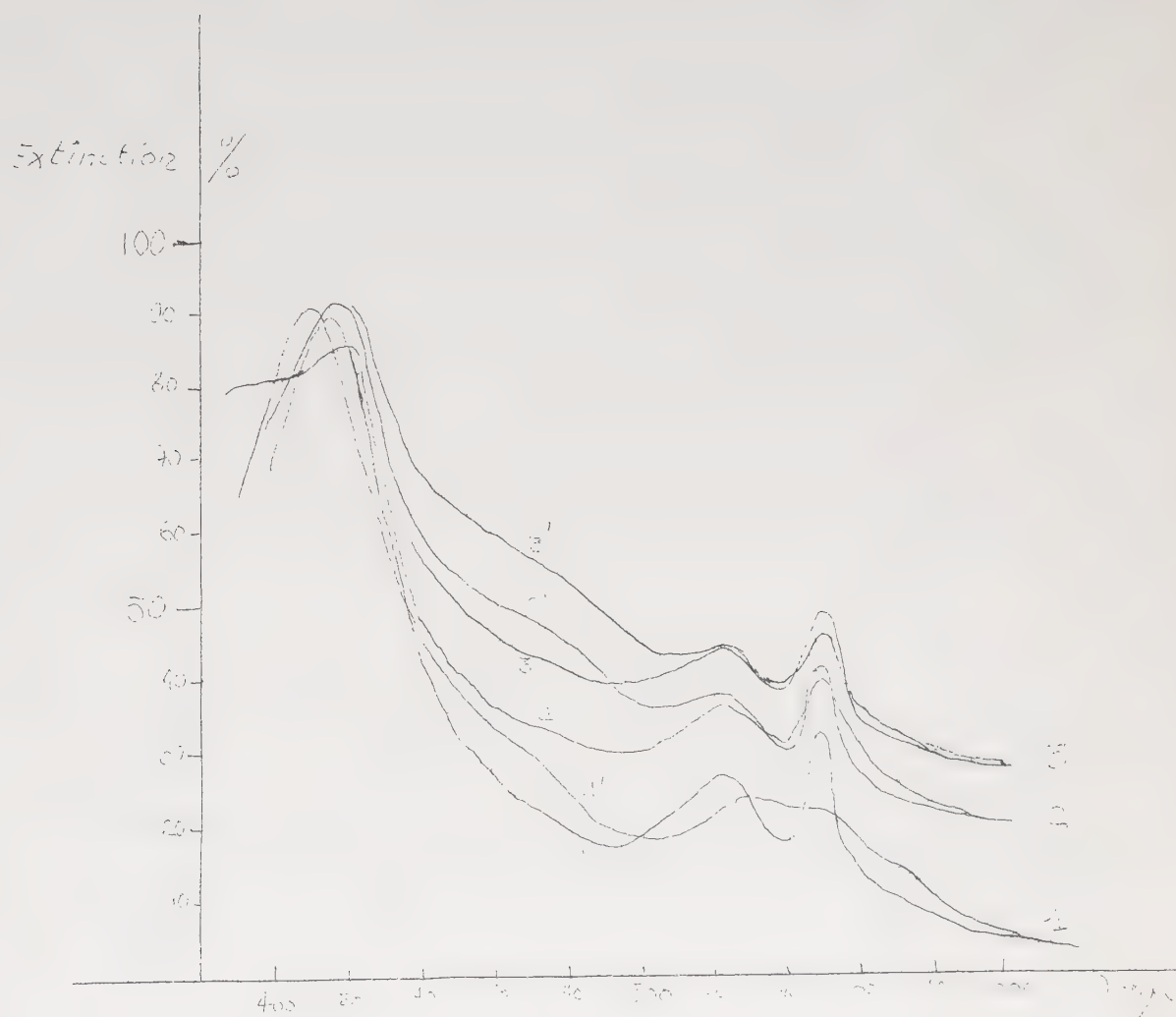


FIGURE N° 31 : Oxydo-réduction du cytochrome c de cœur de rat en présence des extraits acellulaires.

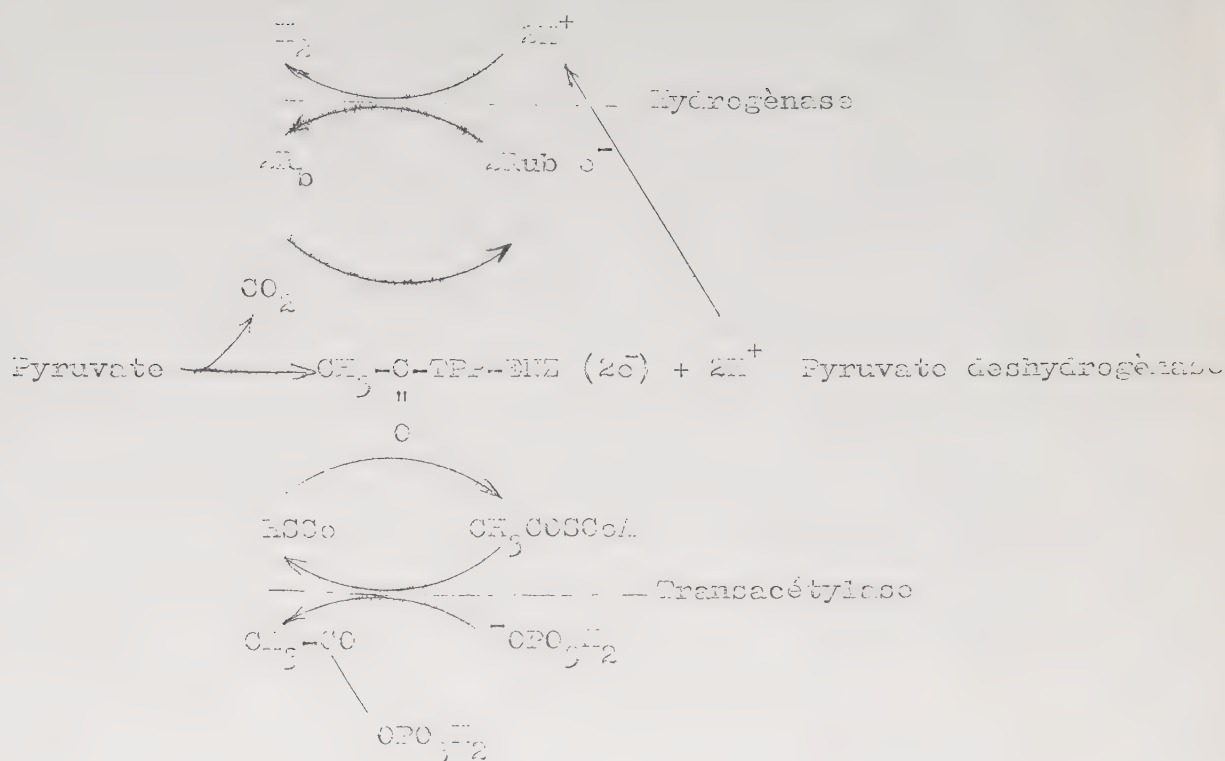
III - DISCUSSION

Les résultats obtenus nous permettent de constater que les extraits acellulaires de Clostridium acetobutylicum contiennent une seconde ferro-protéine (29)(34) que nous avons pu identifier, par des méthodes spectrales, à la rubrédoxine trouvée chez d'autres anaérobies tels que Clostridium pasteurianum (4).

L'isolement de la fraction contenant de la rubrédoxine a conduit à une purification suffisante de la ferrédoxine pour en obtenir la composition en acides aminés qui présente des points communs avec les compositions des ferrédoxines issues des bactéries anaérobies du même genre (17)(35).

Les études biochimiques ont débouché sur la mise en évidence d'un certain nombre de fonctions que nous résumons ci-dessous.

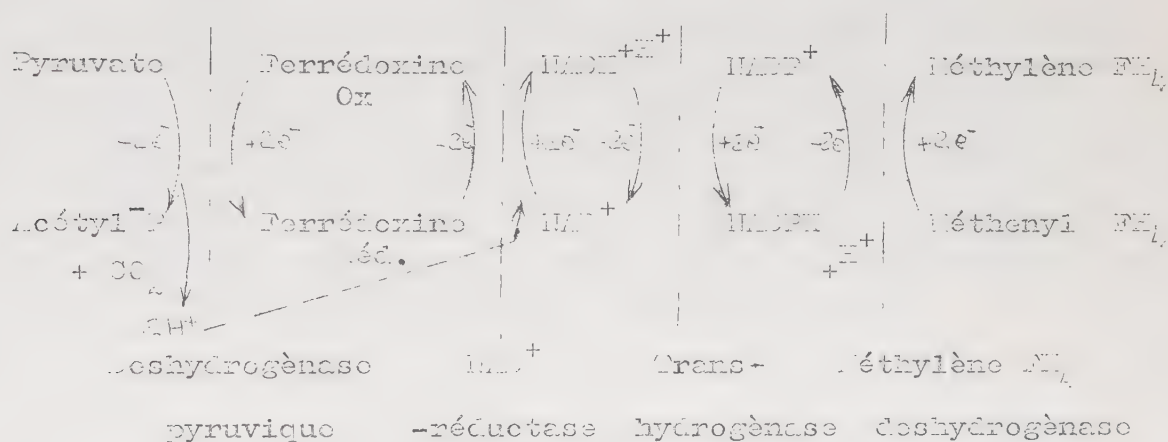
- 1/ - La rubrédoxine peut être réduite en utilisant le pyruvate de sodium comme substrat, comme le montrent les résultats des essais de réaction phosphoroclastique (Voie N° 1). Néanmoins, l'activité de la réaction étant moins forte qu'en utilisant les mêmes quantités de ferrédoxine, cette réduction ne semble pas devoir être la fonction principale liée à cette protéine.

Voie N° 1

2/ - La rubrédoxine réduite par le pyruvate est capable de céder ses électrons de façon réversible à des ions H^+ pour former de l'hydrogène. Si la réaction dans le sens rubrédoxine réduite- H^+ semble devoir être limitée par la cinétique de réduction de la rubrédoxine par le pyruvate, nous avons pu constater que la réduction de la rubrédoxine en présence d'hydrogène et du système hydrogénase de Clostridium acetobutylicum se faisait rapidement.

3/ - L'étude de la réduction de la rubrédoxine par les nucléotides pyridiniques réduits NADH et NADPH, conduit à conclure que les extraits acellulaires possèdent une rubrédoxine-oxido-réductase ne présentant pas une activité très grande in vitro ($\text{U} = 10^{-5}$ U/litre).

La réduction de la rubrédoxine par HADPH ne s'effectue qu'après des temps de latence variant en raison inverse de la concentration de ce substrat. De plus, le temps de latence se trouve réduit et la réaction activée par la présence de Mn^{2+} dans les essais. Ces résultats tendent à indiquer que les extraits acellulaires possèderaient une activité transhydrogénasique comparable à celle des extraits de Clostridium acidi-urici dont VALENTINE et Coll. (43) décrivent l'oxydation du pyruvate d'après le schéma suivant.



Néanmoins, ce microorganisme a un métabolisme assez éloigné de celui de Clostridium acetobutylicum, puisqu'il attaque les purines, l'acide urique, la glycine pour former CO_2 , H_2 et de l'acide acétique sans dégager d'hydrogène.

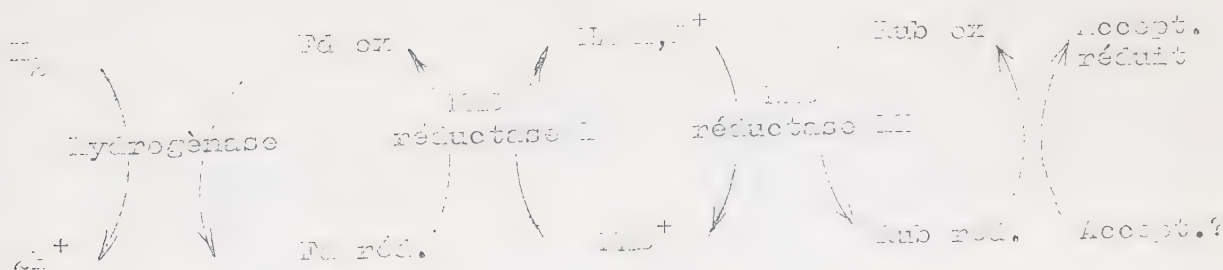
Par ailleurs, au cours d'essais récents dans le Laboratoire (44), il a été montré que la réduction de Mn^{3+} en Mn^{2+} par la Ferrédoxine Mn^{3+} -réductase de Clostridium acetobutylicum était activée si l'on ajoute de faibles doses de Mn^{2+} , mais que cette activation ne dure que le temps de la réaction de Mn^{3+} en Mn^{2+} , ce qui correspondait

à démontrer que les extraits acellulaires ne possèdent pas d'activité transhydrogénasique, soit à confirmer l'hypothèse selon laquelle le microorganisme n'utiliserait pas le coenzyme $NADH^+$.

En définitive, bien que la réduction de la rubrédoxine par $NADPH$ semble être tributaire d'une activité "transhydrogénasique", nous pensons plutôt que la modification de comportement de la rubrédoxine NAD -oxydo-réductase peut être attribuée au fait que le système employé n'est pas purifié et qu'ainsi sa spécificité pour le coenzyme n'est pas absolue. Cependant, les différences d'activité entre $NADH$ et $NADPH$ comme substrat étant en faveur du premier cité, aussi bien en ce qui concerne l'activité spécifique des extraits qu'en ce qui concerne la cinétique de Michaelis-Menten, nous pensons que l'enzyme doit être spécifique vis-à-vis du couple $(NAD^+, NADH^+)$.

4/ - Nous avons réalisé ensuite la réduction de la rubrédoxine en présence de ferrédoxine réduite. La réaction dans son ensemble s'écrit selon la voie n° 2 schématisée ci-dessous.

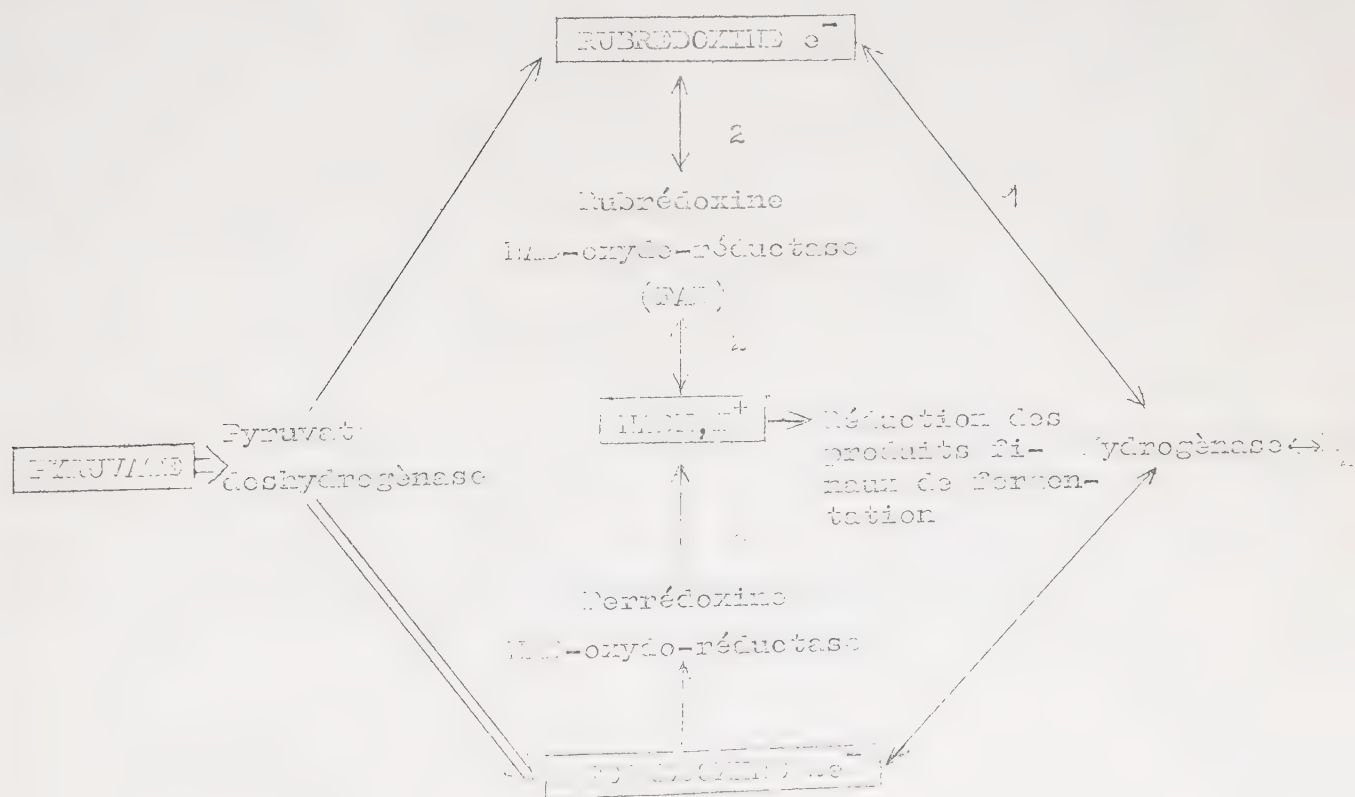
Voie n° 2



Le fait que $NADH^+$ soit nécessaire pour que les électrons passent de la ferrédoxine de bas potentiel $(-417\ mV)$

à la rubrédoxine de potentiel plus haut (-45 mV) indique que l'écart d'énergie est trop grand entre les deux transporteurs et qu'il faut un relais. Il paraît vraisemblable alors, que deux réductases spécifiques, flavoprotéines à NAD^+ , soient associées respectivement à la ferrédoxine et à la rubrédoxine. Ne connaissant pas d'accepteur physiologique à la rubrédoxine pour l'instant, il est possible que la rubrédoxine intervienne dans un complexe enzymatique capable de fournir l'énergie nécessaire à la survie de la cellule.

- 5/ - Considérant les activités résumées dans les trois alinéas précédents, nous essayons de les placer sous forme schématique pour tenter de définir le sens selon lequel le système peut évoluer.



Chez Clostridium acetobutylicum, la réaction phosphoroclastique produit de l'acétyl-phosphate, du H_2S et de l'hydrogène (41) en présence de ferrédoxine. Les électrons fournis à H_2O^+ par la ferrédoxine H_2O -réductase seraient ensuite destinés à la réduction de l'acide butyrique en butanol. Si, selon FREVOT et Coll. (44), le système hydrogénase était inhibé par l'augmentation d'acidité du milieu en seconde phase de fermentation, comme tendent à le confirmer les études de l'activité hydrogénasique des extraits de Clostridium acetobutylicum (56), les électrons ne seraient plus dirigés vers l'hydrogénase qui constitue alors un goulot d'étranglement et seraient préférentiellement utilisés sur la réduction de H_2O^+ .

Dans ce cas, la suite de réactions indiquées par le n° 2 sur le schéma se fera dans le sens ferrédoxine vers rubrédoxine si l'on tient compte du fait que le plus haut niveau d'énergie est atteint pour le plus bas potentiel qui est -017 V pour la ferrédoxine contre -05 V pour la rubrédoxine. Une partie des électrons contenus dans H_2O^+ réduit continuerait à alimenter la réduction des produits terminaux de fermentation et une autre partie de ces électrons serait utilisée par la rubrédoxine pour maintenir la cellule à un niveau énergétique convenable pour qu'elle puisse demeurer active.

Inversement, dans le cas d'une carence en électrons utilisables sous forme d' H_2S , H_2 , la rubrédoxine proche du potentiel 0 pourrait métaboliser à nouveau de l'hydrogène et apporter des électrons par la voie 1 puis 2.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - WILDER H. - VALLENTINE A. C. - ARAGE H. I. -
J. O. Bactériol. 1965 - 66 - 861.
- 2 - BUCHANAN B. B.
Biochemistry 1965 - 49 - 345.
- 3 - MCNEMISCH D. B.
Biochim. Biophys. Acta 1964 - 31 - 71.
- 4 - LOVEMBERG U. - SOBEL D.B.
Biochemistry 1965 - 54 - 195.
- 5 - GALLAGHER G. C.
In NON-IONIC-LIQUID CRYSTALLINITY
Ed. San Pietro - Antiochpress - Yellow Springs - Ohio 1965
459.
- 6 - LANTIER G. G. FORD G. B. -
Biochem. J. 1966 - 100 (2) 88.
- 7 - DE GALL G. - MARCHE N. -
Biochim. Biophys. Res. Comm. 1966 - 25 - 145
- 8 - MULLAN L. J. - POSTGANS J. M. -
European J. Biochemistry 1966 - 7 - 45.
- 9 - LOVEMBERG U. -
HYDROGENS OF THE BIOLOGICAL FLUIDS
14th SYMPOSIUM - DR. FORDING - L. VESLINDER
ALGERIA 1966 - 165.

- 10 - BACHMAYER H. - FLEMMING D. H. - YASUNOBU K. T. -
 MURRAY R. H. -
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1967 - 57 - 122.
- 11 - BERGMAN A. J. - YASU D. - BOON H. J. -
J. Biol. Chem. 1966 - 241 - 5162.
- 12 - KUSUNOSE H. - TAKESUGITA S. - ICHIMURA K. KUSUNOSE E.
 NOLACE J. E.
J. C. Biochemistry 1967 - 61 (5) - 665.
- 13 - LOVENBERG T. - WELLMERS W. L. -
Biochemistry 1969 - 8 - 141.
- 14 - SCOTT E. - SIMMONS A.D. - FOGHES T. R. -
J. Biol. chem. 1938 - 124 - 11.
- 15 - MILLAN G. L. -
Arch. Biochem. Biophys. 1959 - 82 - 70.
- 16 - LOAMBERG W. - BUCHANAN B. B. - WADSWORTH J.C. -
J. Biol. Chem. 1963 - 238 (12) 1999.
- 17 - BUCHANAN B. B. -
Structure Boundings 1966 - 1 - 109.
- 18 - BACHMAYER H. - YASUNOBU K. T. - FEHL J. - WITTM G.G.
J. Biol. Chem. 1968 - 243 (5) - 1022.
- 19 - BACHMAYER H. - YASUNOBU K. T. - WHITEHEAD A. L. -
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1967 - 26 - n° 4
- 20 - GOSWAMI T. U. - MORTON R.A. -
Biochem. J. 1946 - 40 - 626.

- 21 - WEINSTEIN B. -
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1969 - 55 (1) - 109.
- 22 - MATSUBARA E. - SASAKI R.H. - CHAIN R.K. -
J. Biol. Chem. 1968 - 243 - 1725.
- 23 - VALENTINE R.C. - CARMALIAN -
Biochem. Biophys. Res. Comm. 1962 - 7 - 448.
- 24 - LE GALL J. -
Annales de l'Institut Pasteur 1968 - 114 - 109.
- 25 - VALENTINE R.C. - BRILL W.J. - WOLFE R.S. -
Biochemistry 1962 - 48 - 1856.
- 26 - BAPTIST J.N. - GOLDSCH R.K. - COON H.J. -
Biochem. Biophys. Acta 1966 - 69 - 40.
- 27 - KUSUNOSU H. - ICHIHARA K. - KUSUNOSU B. - NOZAKA J. -
TAKESUOGA J. -
Agri. Biol. Chem. 1967 - 31 (6) - 990.
- 28 - BERTHELEIN J. -
Thèse de Doctorat de spécialité de Biochimie
Université de Nancy - Faculté des Sciences Octobre 1967.
- 29 - STATHODRANGE H. - ROSSIGNOL J. - AUGERAS M. - GAY R. -
Bull. Soc. Chimie Biol. 1969 - 51 (1) - 157.
- 30 - HEMERSON J. - KUSUNOSU H. - KUSUNOSU B. - COON H.J. -
J. Biol. Chem. 1967 - 242 - 4334.

- 31 - THOMPSON C.M. -
W.R. Balston L^{td} = public. Whatman 1968
193, rue de l'Université PARIS (7e)
- 32 - GORNALL A.G. - BARDAWILL C.J. - DAVID H.M. -
J. Biol. Chem. 1949 - 177 - 751.
- 33 - CHAYKEN S. -
Biochemistry Laboratory techniques
J. Wileyand Sons, Inc. NEW-YORK - LONDON - SIDIQUI.
- 34 - FERTINDEMANGE H. -
Thèse de Doctorat de Spécialité de Biochimie
Université de NANCY - Faculté des Sciences Novembre 1968
- 35 - BENSON A.H. - HOWER E.F. - YASUNCBU K.T. -
Biochemistry 1966 - 55 - 1538.
- 36 - LINSLEY J.S. - GRAVES J. - PECK H.D. -
J. C. Bact. 1969 - 96 - 302.
- 37 - BUCHANAN B.B. - RUBINOWITZ J.C. -
J. C. Bact. 1964 - 88 - 806.
- 38 - BEEDINGE H. -
Diplôme d'Etudes Approfondies de Biochimie Appliquée
Université de NANCY - Faculté des Sciences 1969.
- 39 - FERTINDEMANGE H. - DESBORDS J. - BERTHELEIN J. - GAY R.
C. R. Acad. Sci. PARIS - Série B - 1968 - 266 - 1772.
- 40 - LIPMAN F. - TUTTLE L.C. -
J. Biol. Chem. 1959 - 77 - 383.

TABLE DES MATIERES

PREMIERE PARTIE

----- * * * -----

ETAT DE NOS CONNAISSANCES SUR LES RUBREDOXINES

----- * * * -----

I - <u>HISTORIQUE et DISTRIBUTION de la RUBREDOXINE</u>	page	1
II - <u>PURIFICATION et ISOLEMENT de la RUBREDOXINE</u>	"	2
III - <u>CHIMIE de la RUBREDOXINE</u>	"	4
A/ - <u>Caractéristiques Spectrales</u>	"	4
B/ - <u>Propriétés Physiques et Chimiques</u>	"	6
1/ - <u>Propriétés Générales</u>	"	8
a) - <u>Poids Moléculaire</u>	"	8
b) - <u>Potentiel d'oxydo-réduction</u>	"	9
c) - <u>Dosage du fer et du soufre</u>	"	10
2/ - <u>Composition en Acides Aminés - Séquence</u>	"	11
3/ - <u>Etude Structurale</u>	"	15
a) - <u>Etat d'oxydation du fer</u>	"	15
b) - <u>Nature des SH</u>	"	17
c) - <u>Reconstitution de la rubrédoxine à partir de l'aporubrédoxine</u>	"	21

d) - <u>Nature de la liaison du fer</u>	page	22
e) - <u>Conclusion de l'Etude structurale</u>	"	25
 IV - <u>APPRÉHENSIONS ENZYMIQUES avec d'AUTRES PROTEINES à FER</u> <u>NON-ENZYMES : les FERRODOXINES</u>	"	25
 V - <u>FONCTIONS de la RUBREDOXINE</u>	"	27
 A/ - <u>Bactéries anaérobies</u>	"	27
a) - <u>Origine des électrons, réduction de la rubredoxine</u>	"	28
b) - <u>Accepteurs possibles d'électrons donnés par la rubredoxine</u>	"	29
 B/ - <u>Bactéries Aérobie</u>	"	35

* * *

PARTIE EXPERIMENTALE

* * *

Ferroprotéines, transporteurs d'électrons chez Clostridium acétobutylicus

I - <u>MATÉRIEL et MÉTHODES</u>	"	36
 A/ - <u>Cellules</u>	"	36
a) - <u>Mode de culture</u>	"	38
b) - <u>Récolte et conservation des cellules</u>	"	39

B/ - <u>Préparation de la rubrédoxine et de la ferrédoxine</u>	page 39
a) - <u>Obtention des extraits acellulaires</u>	" 39
b) - <u>Chromatographie des Extraits acellulaires</u>	" 40
1/ - <u>Principe</u>	" 40
2/ - <u>Préparation des colonnes</u>	" 41
3/ - <u>Purifications</u>	" 43
c) - <u>Essai de cristallisation</u>	" 48
d) - <u>Contrôle des purifications</u>	" 49
1/ - <u>Dosage des protéines</u>	" 49
2/ - <u>Dosage des acides aminés</u>	" 50
3/ - <u>Pureté spectrale</u>	" 50
4/ - <u>Reproductibilité des essais</u>	" 51
C/ - <u>Préparation d'extraits enzymatiques dépourvus de ferrédoxine</u>	" 53
a) - <u>Obtention</u>	" 53
b) - <u>Traitements</u>	" 53
1/ - <u>Élimination de la ferrédoxine et de la rubrédoxine</u>	" 53
2/ - <u>Activation des extraits</u>	" 54
D/ - <u>Mesures des activités enzymatiques liées à la rubrédoxine</u>	" 54
a) - <u>Caractéristiques spectrales</u>	" 54
1/ - <u>Étude qualitative</u>	" 54
2/ - <u>Étude quantitative</u>	" 55

b) - <u>Disposition pour obtenir des conditions d'anaérobiose stricte</u>	page 55
1/ - <u>Appareillage</u>	" 55
2/ - <u>Mise en anaérobiose des constituants réactionnels</u>	" 56
3/ - <u>Activité spécifique des extraits</u>	" 57
c) - <u>Réaction phosphoroclastique</u>	" 57
II - <u>RÉSULTATS</u>	" 57
A/ - <u>Ferrédoxine</u>	" 57
a) - <u>Aspect des cristaux - Spectre UV-visible</u>	" 57
b) - <u>Analyse des acides aminés</u>	" 59
1/ - <u>Composition</u>	" 59
2/ - <u>Comparaison avec d'autres ferrédoxines</u>	" 61
c) - <u>Amélioration des purifications</u>	" 62
B/ - <u>Rubrédoxine</u>	" 64
a) - <u>Propriétés spectrales - Réduction chimique</u>	" 64
b) - <u>Réduction de la rubrédoxine par l'hydrogène</u>	" 64
1/ - <u>Variations spectrales</u>	" 64
2/ - <u>Activité spécifique des extraits en atmosphère saturée d'hydrogène</u>	" 65
c) - <u>Mise en évidence de la rubrédoxine HAD-oxydo-réductase</u>	" 57
1/ - <u>Variations de spectre UV-visible</u>	" 57
2/ - <u>Etude cinétique</u>	" 59

3/ - <u>Réactivité vis-à-vis de NADPH</u>	page	73
4/ - <u>Activité "transhydrogénasique" apparente des extraits acellulaires vis-à-vis de la réduction de la rubrédoxine par NADP</u>	"	77
d) - <u>Comparaison des cinétiques obtenues avec NADH et NADPH comme substrats</u>	"	79
e) - <u>Réduction par la réaction de décarboxylation oxydative du pyruvate de sodium</u>	"	80
f) - <u>Eventualité d'un transfert d'électrons entre ferrédoxine et rubrédoxine</u>	"	81
1/ - <u>Variations spectrales</u>	"	81
2/ - <u>Etude cinétique</u>	"	84
g) - <u>Réduction du cytochrome C de mammifère</u>	"	86
III - <u>DISCUSSION</u>	"	89
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	"	95
<u>TABLE DES MATIERES</u>	"	100

